

Université de Montréal

**Recherche par immunobuvardage et immunohistochimie d'un
récepteur de type RXR chez le cnidaire *Renilla koellikeri***

Par

Meriem Bouzaïene

Département des sciences biologiques

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.sc) en sciences biologiques

Mai 2006

© Meriem Bouzaïene 2006



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé:

**Recherche par immunobuvardage et immunohistochimie d'un
récepteur de type RXR chez le cnidaire *Renilla koellikeri***

Présenté par :

Meriem Bouzaïene

A été évalué par un jury composé de :

Dre. Thérèse Cabana (présidente)

Dr. Michel Anctil (directeur de recherche)

Dre. Annie Angers (Codirectrice)

Dr. Jean-François Pflieger (membre)

Mémoire accepté le :

Sommaire

Les récepteurs rétinoïques sont des récepteurs nucléaires connus pour leur implication dans plusieurs processus biologiques chez les vertébrés qui sont essentiellement : le développement, la reproduction et la vision. Des études antérieures laissent planer la possibilité de la présence de récepteurs à acide rétinoïque chez les cnidaires et les spongiaires. Ce projet fut particulièrement inspiré par la publication de résultats montrant que la méduse *Tripedalia cystophora* possède un récepteur de l'acide rétinoïque présentant une homologie remarquable avec un type de récepteur à l'acide rétinoïque (RXR) des vertébrés. Ces données montrent que chez une espèce appartenant aux Cnidaires, qui forment un phylum ancien des invertébrés, existait déjà RXR. Ces travaux suscitent l'hypothèse d'une présence plus vaste de récepteurs RXR parmi les cnidaires et de la pertinence fonctionnelle de ces récepteurs chez ces animaux. Dans cette perspective nous avons entrepris de vérifier la présence ainsi que la distribution tissulaire d'un récepteur de type RXR chez deux cnidaires appartenant à une classe distincte de celle des méduses (hydrozoaires). Il s'agit de la pensée de mer *Renilla koellikeri* et du corail *Acropora millepora*, membres de la classe des anthozoaires représentant les octocoralliaires et les hexacoralliaires, respectivement.

Dans un premier temps, nous avons employé la technique d'immunobuvardage de type Western. Cette technique nous a permis de détecter l'existence chez la pensée de mer d'une protéine apparentée au RXR grâce à la visualisation d'une bande de 64 Kd de poids moléculaire réagissant avec l'anticorps dirigé contre un fragment de

la séquence d'acides aminés (résidus 256-268) du récepteur RXR alpha. L'étape suivante consistait à identifier les cellules cibles du ligand de ce récepteur en utilisant la technique d'immunohistochimie afin d'observer la distribution des sites récepteurs RXR chez la pensée de mer et le corail. L'immunoréactivité a été observée au niveau de l'ectoderme des polypes, plus spécifiquement dans un plexus de cellules sensorielles chez la pensée de mer et dans des pseudo-neurones basio-ectodermiques chez le corail. Aucune immunoréactivité ne fut détectée dans les larves de corail.

Ces résultats suggèrent que, comme chez les chordés, le récepteur RXR semble impliqué dans la spécification des neurones épidermiques chez les cnidaires. Ce rôle, ainsi que le rôle de transduction méritent d'être vérifiés expérimentalement dans le futur.

Mots clés : anthozoaires, cnidaires, ectoderme, immunobuvardage, immunohistochimie, cellule nerveuse, acide rétinoïque, récepteurs nucléaires.

Summary

Retinoic acid receptors are nuclear receptors known for their implication in several biological processes in vertebrates such as reproduction, development and vision. Previous studies suggest the presence of retinoic acid receptors in a cnidarian and a sponge. This project was particularly motivated by the publication of results showing that the jellyfish *Tripedalia cystophora*, possesses a retinoic acid receptor sharing a remarkable homology with vertebrates RXR. These data show that in cnidaria, which is a basal phylum of invertebrates, RXR receptors already existed. and prompted us to suspect the existence of a retinoic acid receptor RXR in the anthozoan class of cnidarians.

We attempted to test the presence of a RXR and its distribution in the tissues of two anthozoans, the sea pansy *Renilla koellikeri* (octocoralia) and the staghorn coral *Acropora millepora* (hexacoralia). The technique of Western blot allowed us to verify the existence of RXR-like receptor sites by visualizing a band with the predicted molecular weight of 64 Kd reacting with the antibody against the sequence of amino acid (256 to 268) of the human RXR receptor. On the basis of these results, immunohistochemistry was used in order to determine the distribution of RXR immunoreactive cells in the sea pansy and the staghorn coral.

The immunoreactivity was found in the ectoderm of the polyp, specifically in a nerve net of sensory cells in the sea pansy and in putative differentiating basiepidermal nerve cells in the staghorn coral. No immunoreactivity was found in the larvae of the staghorn coral.

These results suggest that, as in chordates, this RXR-like appears to be involved in neuronal specification of epidermal neurons in the cnidarians. This role and associated transduction pathways need to be tested experimentally in the future.

Key words: anthozoan, cnidaria, ectoderm, western blot, immunochemistry, nervous cells, retinoic acid receptor, nuclear receptor.

Table des matières

Sommaire	i
Summary	iii
Table des matière.....	v
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	viii
Décidace.....	x
Remerciements.....	xi
 I. Introduction.....	1
I.1 Les rétinoïdes, dérivés actifs de la vitamine A.....	2
I.2 Réactions biochimiques.....	4
I.3 Récepteurs de l'acide rétinoïque: structure et fonction	7
I.3.1 Deux types de récepteurs: RAR et RXR	7
I.3.2 Structure des récepteurs de l'acide rétinoïque	10
I.3.3 Interaction du récepteur de l'acide rétinoïque avec l'ADN.....	11
I.3.4 Interaction du récepteur de l'acide rétinoïque avec le ligand	14
I.3.5 Régulation de la transcription.....	15
I.4 Rôle de l'acide rétinoïque dans le développement.....	18
I.4.1 Carence et excès en acide rétinoïque.....	19
I.4.2 Rôle de l'acide rétinoïque dans la reproduction et à différents stades embryonnaires	21
I.4.3 L'acide rétinoïque et le cancer.....	23

I.4.4 Rôle dans le développement de la moelle épinière et des motoneurones	24
I.4.5 Évolution des récepteurs RXR/RAR.....	26
I.5 Modèles expérimentaux : <i>Renilla koellikeri</i> et <i>Acropora millepora</i>.....	28
I.5.1 Organisation morphologique de la pensée de mer et d'Acropora.....	28
I.5.2 Organisation histologique.....	32
I.5.2.1 L'ectoderme.....	32
I.5.2.2 La mésoglée.....	33
I.5.2.3 L'endoderme	34
I.5.3 Description du système nerveux chez les cnidaires anthozoaires.....	35
I.6 Hypothèse et objectif du travail	39
II. Article Evidence for the presence of a retinoic acid-like receptor in two colonial anthozoans (Cnidaria)	41
Abstract.....	43
Introduction.....	44
Materials and methods.....	47
Results.....	52
Discussion.....	55
References	60
Legends to figures.....	63
III. Discussion générale et conclusion	68
Références.....	76

Liste des figures

I- INTRODUCTION

I.3.1	Structure des rétinoïdes.....	6
I.3.2	Les principaux domaines fonctionnels de RAR et de RXR.....	9
I.3.3	Modèle de deux types de deux surfaces de dimérisation Coopératives entre DLA, RAR ou RXR ou TR.....	13
I.3.5	Schéma de la régulation de la transcription par le récepteur rétinoïque.....	18
I.5.1	Dessin détaillé d'une colonie de <i>Renilla koellikeri</i>	31
I.5.2	Représentation schématique de l'innervation d'une portion de l'anémone de mer <i>Mimetridium cryptum</i>	37
I.5.2	Diagramme schématique illustrant l'organisation générale de la pensée de mer.....	38

II-ARTICLE

Fig.1	Imunobuvardage avec l'extrait de cerveau de rat et les extraits de pensée de mer.....	64
Fig.2	Histological organisation of the sea pansy.....	64-A
Fig.3-4	Immunohistochimie chez la pensée de mer sur des polypes in toto.....	65
Fig.5-6	Immunohistochimie chez la pensée de mer sur des coupes.....	66
Fig 7-9	Immunohistochimie chez <i>Acropora</i> sur des polypes in toto.....	67

Liste des abréviations

ADN :	desoxyribonucleic acid
CBP:	adenosine monophosphate cyclic binding protein
Cyp26 :	cytochrome P450, family 26
AF-1 :	activation function-1
AF-2 :	activation function-2
DLA :	DNA binding domain
DLL :	ligand binding domain
DR :	direct repeat
DVA :	deficient in vitamine A
EcR:	ectysteroid receptor
En :	engrailed gene
ER :	everted repeat
FGF :	fibroblast growth factor
GFP :	green fluorescent protein
GR:	glucocorticoide receptor
HAT :	histone acetyltransferase
HDAC :	histone deacetylase
Hox :	homeotic genes
IR :	inverted repeat
Kd :	kilo dalton
CML :	colonne motrice latérale
mM :	millimolaire
MMC :	medial motor column
MYB :	myeloblastosis oncogene
NAD :	deshydrogenase
NCoR :	nuclear receptor corepressor
PBST:	phosphate buffer saline-triton
PML :	promyelocytic leukemia

RALDH 2 :	dehydrogenase retinaldehyde 2
RAR :	retinoic acid receptor
RHT :	thyroid hormone receptors
RXR :	retinoic X receptor
SMRT :	silencing mediator for retinoid and thyroid receptor
SR:	steroid receptor
TR :	thyroid receptor
USP:	ultraspiracle
VDR:	vitamine D receptor
µm :	micromètre

À Maman, Papa, Walid, Fathia et Mustapha

Remerciements

Je tiens à remercier Mr Anctil pour la pertinence de ses conseils dans l'élaboration de ce projet, pour la rapidité de ses corrections lors de la rédaction du mémoire et de l'article ainsi que pour ses encouragements et sa confiance en moi.

Je remercie également Mme Angers pour m'avoir guidée et conseillée lors de mes expériences, pour s'être intéressée à mon projet avec beaucoup d'esprit critique constructif et pour ses corrections, je remercie également toute l'équipe de son laboratoire plus particulièrement : Mme Mouchantaf.

Je remercie Mme Cabana ainsi que Mr Pfilger pour avoir bien voulu faire partie du jury d'évaluation de ce mémoire, pour leurs commentaires et pour leurs encouragements.

Je remercie Mathieu Collette et Sandrine Joly pour m'avoir aidée à démarrer les expériences de ce projet.

Je remercie Mme Cabana (à titre de directeur de département) et Mme Aubut Moussette pour leur professionnalisme et pour m'avoir aidé à passer les périodes difficiles.

Je tiens à remercier tout le personnel du département pour leurs conseils et leur aide précieuse, tout particulièrement : Hélène Lavigne, Louise Pelletier, Jean Luc Verville, Renée Forget, Diane Guertin, Diane Lacasse et Daniel Gingras.

Je remercie mon époux Walid pour son écoute, ses conseils et son aide incontestable durant cette période.

Je remercie ma mère qui m'a toujours poussée à aller de l'avant.

Je remercie, mon père mes beaux parents, tata Radhia et tous les membres de ma famille pour être là et pour m'avoir apporté tout le soutien moral nécessaire.

Je finis en remerciant tous mes amis au Canada, pour être à mes côtés et me faire oublier par moment que je ne suis pas en Tunisie!!

Chapitre I

I. Introduction

L'intérêt pour les récepteurs de l'acide rétinoïque connaît une apogée ces dernières années étant donné l'implication de l'acide rétinoïque dans le traitement de certains types de leucémie. La présence de récepteurs analogues aux récepteurs rétinoïques chez le cnidaire *Tripedalia cystophora* suggère sa présence chez d'autres cnidaires tels que la pensée de mer *Renilla koellikeri*.

Ce mémoire est consacré principalement à l'étude des récepteurs rétinoïques chez la pensée de mer *Renilla koellikeri* au moyen de deux techniques, l'immunobuvardage et l'immunohistochimie. Nous abordons d'abord dans l'introduction, une revue de la littérature concernant les récepteurs rétinoïques, ce qui donne une idée sur la structure de ces récepteurs, leurs modes d'action ainsi que leurs principaux rôles. La partie suivante est consacrée à la description de l'organisation générale du modèle expérimental, la pensée de mer. Ensuite nous présentons la partie traitant de la description histologique des différentes couches tissulaires de l'animal afin que le lecteur puisse avoir des repères histologiques qui

lui permettent de mieux comprendre les résultats obtenus. Cette partie est suivie par l'hypothèse et le but du travail.

I.1 Les rétinoïdes, dérivés actifs de la vitamine A

L'acide rétinoïque est le principal dérivé actif de la vitamine A. La vitamine A, appelée aussi rétinol, est un nutriment impliqué dans des processus physiologiques divers et qui sont essentiellement la vision, la reproduction et le développement. L'acide rétinoïque se retrouve dans les aliments riches en vitamine A comme les carottes, les mangues, les épinards et les viandes comme le foie de bœuf.

La déficience alimentaire en vitamine A est la cause de plusieurs anomalies congénitales qui touchent les yeux, le cœur et le système circulatoire (Lequeu, 1990). En effet, le manque de vitamine A chez les enfants dans les pays en voie de développement est la cause principale de cécité. Cette carence contribue aussi de façon significative à l'apparition d'infections sévères, particulièrement de la rougeole (Underwood et Arthur, 1996). Les programmes de santé publique ont prévu d'introduire des régimes alimentaires riches en vitamine A, auprès des populations des pays en voie de développement et surtout les pays d'Asie, où l'alimentation repose principalement sur la culture du riz et où la vitamine A fait cruellement défaut. Par ailleurs, un excès diététique en vitamine A cause l'hypervitaminose A qui se caractérise par l'intoxication du système nerveux, des os, du foie et de la peau.

La découverte des rétinoïdes date du début du vingtième siècle lorsqu'on commença à s'intéresser au rôle de la vitamine A (Bollag, 1996). Cette découverte causa une révolution, à cause de l'intérêt majeur que présentent ces composés qui

sont impliqués dans plusieurs processus biologiques et physiologiques. En effet, ils exercent des effets multiples chez l'embryon et l'adulte. On a aussi montré leur implication dans le processus de différenciation cellulaire et l'apoptose, à différents stades du développement des vertébrés (Bollag, 1996). De même, on a montré que les rétinoïdes peuvent affecter la prolifération et la différenciation de plusieurs lignées cellulaires en culture (Roberts et Sporn, 1984).

Les mécanismes d'action de l'acide rétinoïque ont commencé à être élucidés grâce au clonage et à l'identification de récepteurs cellulaires et nucléaires pour le transport et l'action des rétinoïdes. Les différentes investigations sur les récepteurs rétinoïques ont permis d'identifier certains événements génétiques et physiologiques liés à l'action de l'acide rétinoïque (Chambon, 1996). Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression de nombreux gènes. Les voies de régulation par l'acide rétinoïque sont régies par ses récepteurs, les cascades de liaison présentes dans les régions promotrices des gènes cibles (Hox) et l'interaction avec d'autres protéines.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, l'acide rétinoïque a d'importants rôles dans la physiologie cellulaire normale et dans le développement embryonnaire. De plus il a été démontré qu'il est impliqué dans le processus de transformation maligne (Roberts et Sporn, 1984). En effet, les rétinoïdes agissent directement sur les cellules néoplasiques pour supprimer le processus de transformation maligne induit par des agents chimiques, viraux ou physiques.

I.2 Réactions biochimiques

Les précurseurs du rétinol sont les caroténoïdes issus des fruits et des légumes et les rétynyls esters issus des animaux. Les rétinoïdes existent sous plusieurs formes (Figure.1). Leur synthèse peut être modulée de façon spécifique pour chaque type cellulaire. Il peut sembler improbable que de petites quantités de simples substances liposolubles puissent communiquer des informations aussi diversifiées, mais l'action des rétinoïdes est le résultat de la communication et de la coordination entre plusieurs composés : des hormones, des protéines de liaison, des récepteurs et des enzymes. Cette coordination se produit chez tous les organismes selon un patron spécifique (Napoli, 1996).

Dans sa forme libre, un rétinoïde se liant à une protéine de liaison (rétinol cellulaire liant la protéine) sert de modulateur de la concentration d'enzymes, qui catalysent le métabolisme du rétinol. Cette liaison peut aussi servir de substrat pour le métabolisme de quelques rétinoïdes (Napoli, 1996). La synthèse de l'acide rétinoïque comprend deux étapes. La première étape est celle de la conversion du rétinol en rétinaldéhyde. Cette réaction est catalysée par les alcool déshydrogénases et les déshydrogénases/réductases. Cette étape est réversible. La deuxième étape, qui est irréversible, est la conversion du rétinaldéhyde en acide rétinoïque, catalysée par la famille des aldéhydes déshydrogénases. Ces réactions de conversion sont très importantes et se révèlent nécessaires à la survie de l'embryon en cours de développement. En effet, parmi les enzymes qui catalysent ces réactions la rétinaldéhyde déshydrogénase 2 se révèle particulièrement primordiale. Dans le cas de la souris, l'invalidation du gène *raldh-2* (codant la rétinaldéhyde

déshydrogénase 2) cause la mort de l'embryon. L'embryon, qui meure à mi-gestation, présente des malformations majeures dont une importante déformation cardiaque, l'absence de rotation axiale et l'absence de formation de bourgeons de membre (Niederreither et al., 1999). Cette dernière anomalie est due au fait que la synthèse de l'acide rétinoïque dans le membre est sous la commande de la rétinaldéhyde déshydrogénase-2 (Raldh2). En effet, les embryons Raldh2 -/- souffrent du manque d'activité mésodermique de l'acide rétinoïque dans le tronc et échouent donc dans la formation de bourgeons de membre (Mic et al., 2004). Ces anomalies résultent d'un manque dans la synthèse embryonnaire d'acide rétinoïque. Ces données établissent que le manque d'acide rétinoïque chez l'embryon de mammifère cause des troubles du développement qui mènent à la mort précoce.

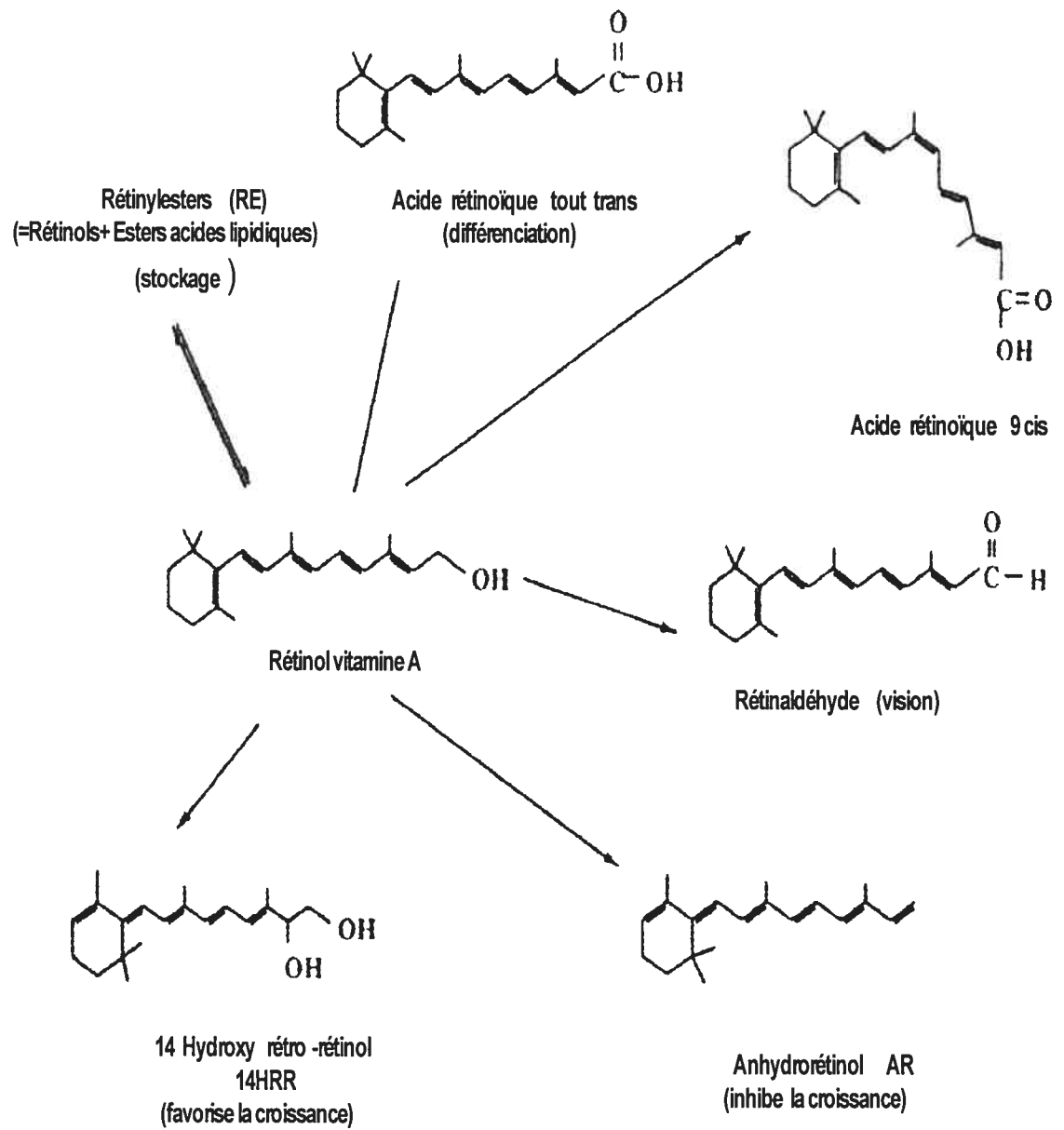


Figure.1: Structure des rétinoïdes (d'après Means et Gudas, 1995).

I.3 Récepteurs de l'acide rétinoïque: structure et fonction

I.3.1 Deux types de récepteurs: RAR et RXR

Une source importante de la diversité d'action de l'acide rétinoïque provient de l'existence de deux familles de récepteurs (RAR et RXR) incluant trois isotypes de RAR (alpha, bêta et gamma) et trois isotypes de RXR (alpha, bêta et gamma). Il existe également de nombreux isoformes qui se lient comme hétérodimères RXR/RAR aux gènes cibles (Chambon, 1996).

Les récepteurs de l'acide rétinoïque font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils résident généralement dans le noyau et ont la capacité de se lier à l'ADN au niveau de séquences spécifiques. On trouve ces séquences dans les régions promotrices de certains gènes. Les récepteurs agissent comme facteurs de transcription et contrôlent donc l'expression génique. La structure et le mode d'action des récepteurs RAR (Retinoic Acid Receptor) et RXR (Retinoic X Receptor) sont similaires mais ils possèdent toutefois des affinités très différentes pour les divers rétinoïdes naturels et synthétiques (Chambon, 1996). Les RAR lient l'acide rétinoïque trans et 9-cis avec la même affinité et sont activés par ces deux isomères. La différence entre les différents isotypes réside essentiellement dans la séquence d'acides aminés au niveau de la région B pour les RAR. En ce qui concerne les RXR la différence réside dans la région N-terminale précisément au niveau de la région A/B (Leid et al., 1992).

D'autre part, les RXR se lient uniquement à l'acide rétinoïque 9-cis, ils sont donc activés par cette liaison (Allegretto et al., 1993). Suite à la liaison de leur ligand, les récepteurs vont généralement former des hétérodimères RAR/RXR ou

des homodimères RXR/RXR (Fig. 2-B) et lier des séquences régulatrices de certains gènes (Gudas, 1994).

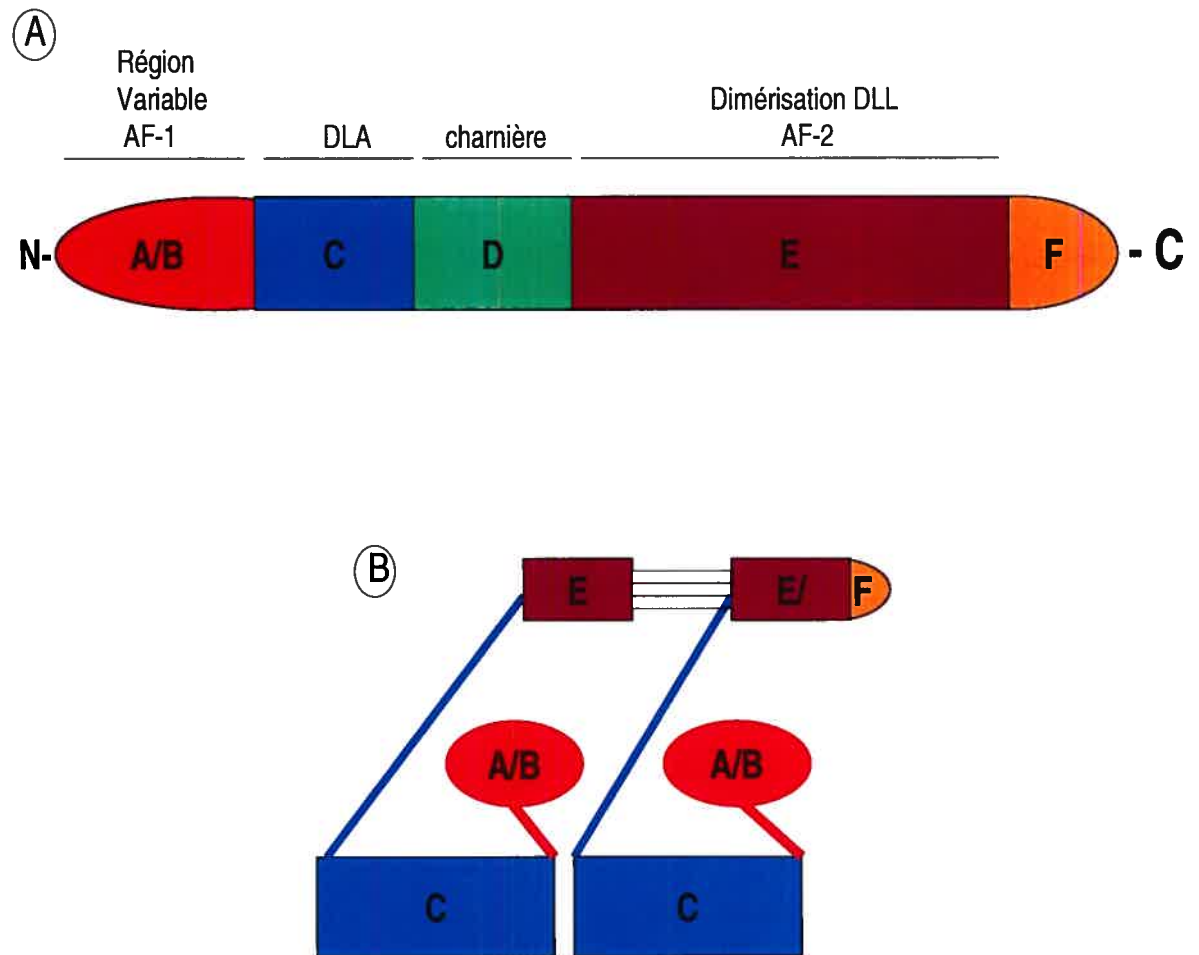


Figure. 2 A- Les principaux domaines fonctionnels de RAR et de RXR. L'extrémité N-terminale A/B code pour le domaine d'activation (AF-1). Le segment C code pour le domaine de liaison de l'ADN (DLA). Le segment D code pour une région charnière flexible. Le segment E code le domaine de liaison du ligand (DLL) et pour le domaine de transactivation 2 (AF-2). Le domaine F contient l'extrémité C-terminale qui est présente uniquement dans certains récepteurs. **B-** Modèle de dimérisation de deux récepteurs rétinoïques.

I.3.2 Structure des récepteurs de l'acide rétinoïque

Comme tous les récepteurs nucléaires, les récepteurs rétinoïques, possèdent une structure constituée de six domaines de A à F (Figure.2). Il existe beaucoup de ressemblances entre RAR et RXR au niveau de leur structure primaire (Chambon, 1996).

Les domaines A/B qui représentent l'extrémité N-terminale sont les domaines les moins conservés et contiennent une fonction d'activation autonome, appelée AF-1. Le domaine C est le domaine le plus fortement conservé et contient deux doigts de zinc hautement conservés entre les trois sous types de RAR (94-97%) et de RXR (91-97%) (Chambon, 1996). Ces deux doigts de zinc sont responsables de l'attachement de l'ADN. Ce domaine est ainsi appelé le domaine de liaison à l'ADN (DLA). Il contient approximativement 66 acides aminés. La région à la base du premier doigt de zinc est appelée la boîte D. Elle a pour fonction de distinguer les séquences d'ADN, tandis que la région à la base du deuxième doigt participe à la dimérisation du récepteur. Le domaine D représente la région charnière. Il est variable et relie le doigt de zinc (DLA) à la région E qui entoure le domaine de liaison du ligand (DLL). La région E est aussi hautement conservée entre différents RAR (84-90%) et RXR (88-95%). Cette région est complexe sur le plan fonctionnel puisqu'elle contient le domaine de liaison au ligand DLL et un domaine d'activation de la transcription dépendante du ligand AF-2. Le DLL est un domaine multifonctionnel responsable de l'attachement du ligand, de la dimérisation du récepteur et de l'interaction avec d'autres protéines comme les coactivateurs. Le

domaine F qui représente l'extrémité C-terminale, est retrouvé uniquement dans les RAR.

En se liant à l'acide rétinoïque, le récepteur, qui a une structure en hélice, change de conformation. Ceci implique un changement dans l'interaction des protéines et la stimulation du recrutement des coactivateurs, menant à l'activation de la transcription du gène. Ces récepteurs sont activés essentiellement par leurs ligands qui sont les rétinoïdes, il y a néanmoins des cas où ceux-ci peuvent être activés par d'autres ligands comme les protéines kinases et les métabolites (Wei, 2003).

I.3.3 Interaction du récepteur de l'acide rétinoïque avec l'ADN

Plusieurs surfaces du domaine de liaison de l'ADN (DLA) sont impliquées dans les processus d'homodimérisation et d'hétérodimérisation (Dong et Noy, 1998).

La dimérisation des domaines de liaison de l'ADN (DLA) ne peut se faire de façon efficace que sur les éléments de type DR ou Direct repeat (Chambon, 1996).

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des facteurs transcriptionnels, puisque les récepteurs activés contrôlent l'expression de certains gènes en se liant à de courtes séquences d'ADN présentes dans les promoteurs de ces gènes. Ces séquences sont appelées: éléments de réponse de l'acide rétinoïque.

Les éléments de types DR sont des séquences d'ADN (PuT(G/T)TCA) qui sont directement répétées (d'où leur nom Direct Repeat). Ces séquences sont séparées par 1 à 5 paires de bases. Dans d'autres cas, l'attachement coopératif des hétérodimères est moins efficace et dépend entièrement des surfaces de

dimérisation présentes dans le domaine de liaison au ligand (DLL) (Chambon, 1996).

L'hétérodimère RXR:RAR se lie préférentiellement aux éléments directement répétés avec l'espacement de deux (DR2) ou cinq (DR5) paires de bases. L'homodimère RXR:RXR se lie aux éléments DR1, ces liaisons sont dues à l'interaction coopérative et aux encombrements stériques qui existent entre ces éléments et les domaines de liaison de l'ADN (DLA) (Zechel et al., 1994) (Figure.3).

Les éléments de la séquence d'ADN reconnus par les récepteurs de l'acide rétinoïque sont de plusieurs types: les éléments directement répétés (DR) qui sont $AGGTCAn_xAGGTCA$ (ou bien la séquence complémentaire $TGACCTn_xTGACCT$), les éléments inversés Inverted Repeat (IR) $AGGTCAn_xTGACCT$ et les éléments Renversés Everted Repeat (ER) $TGACCTn_xAGGTCA$, où n_x correspond au nombre de nucléotides qui séparent les deux petites séquences, ce nombre peut varier de 0 à 8 (Sandelin et Wasserman, 2004).

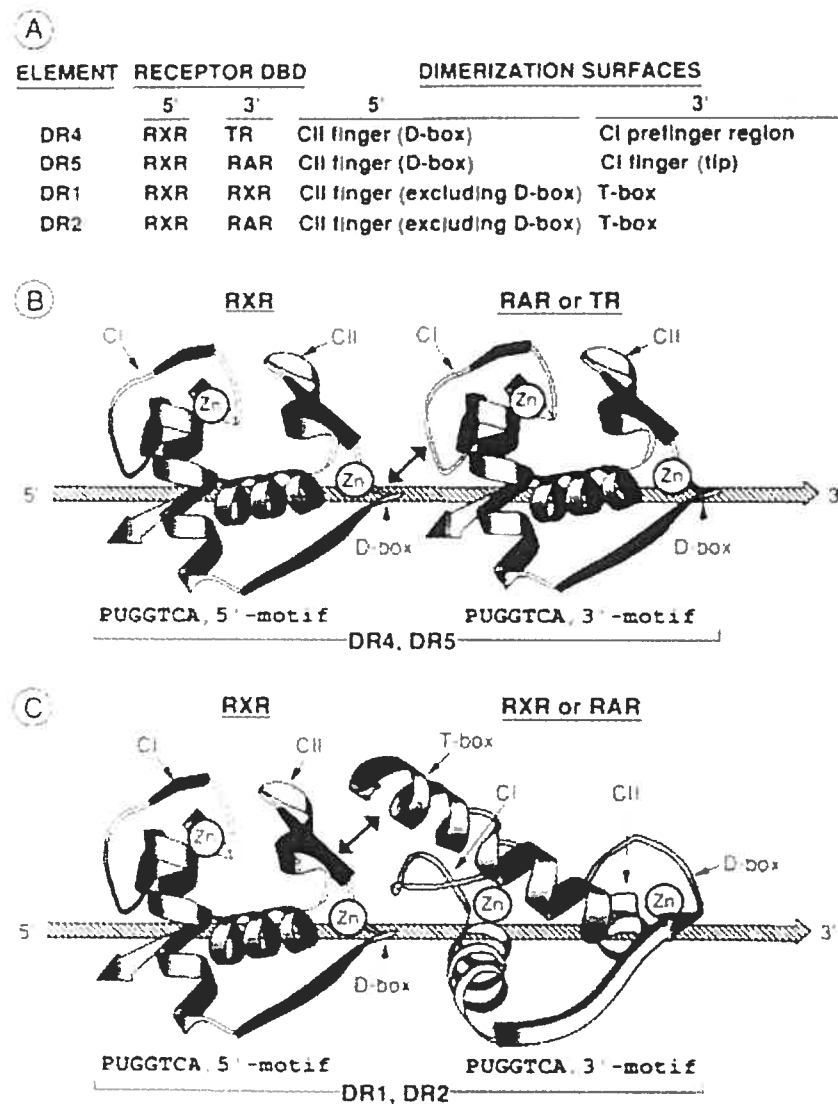


Fig. 3: Modèle de deux types de deux surfaces de dimérisation coopératives entre DLA, RAR ou RXR ou TR.

A: Les interactions des protéines responsables de la liaison à l'ADN et DR1 (RXR), DR2 et DR5 (RXR et RAR) et DR4 (RXR et TR).

B: Représentation de deux monomères de GR DBD liés à leurs éléments de réponses.

C: Schéma similaire au schéma B mais ici le monomère localisé en 3' a subi une rotation de 90 degrés par rapport au monomère situé en 5' pour montrer leur orientation par rapport aux éléments DR1 et DR2. (Texte et schémas d'après Zechel et al., 1994).

I.3.4 Interaction du récepteur de l'acide rétinoïque avec le ligand

Le DLL se lie à son ligand naturel qui est l'acide 9-cis-rétinoïque. L'activation de la médiation par le ligand de RAR dépend d'une région hélicoïdale carboxy-terminale située dans le domaine de liaison du ligand (DLL) (Lefebvre et al., 2002). Cette région correspond à la fonction d'activation de la transcription dépendante du ligand AF-2. Contrairement à la dimérisation de DLA, dans le cas de DLL, la dimérisation favorise l'attachement coopératif avec une efficacité semblable entre chacune des trois classes d'éléments de réponse DR, IR, et ER et le récepteur rétinoïque (Lee et al., 1998).

L'interface de dimérisation de DLL joue un rôle dans l'initiation de la formation des hétérodimères en solution qui, à leur tour, acquièrent la capacité de se lier à un certain nombre de répétitions différemment organisées (Lee et al., 1998).

Des études *in vitro* montrent que la liaison des hétérodimères RAR:RXR à l'ADN ne dépend pas du ligand. De plus, des expériences faites dans des érythroblastes montrent que la variante oncogénique du récepteur des hormones thyroïdiennes alpha: RHT α qui est également un récepteur nucléaire, se lie *in vivo* à un élément de réponse dans le promoteur de l'anhydrase carbonique II. La liaison à l'ADN ne dépend pas du ligand dans le cas de ce récepteur nucléaire puisque les mutations dans v-erbA empêchent la liaison du ligand (Ciana et al., 1998).

I.3.5 Régulation de la transcription

On connaît aujourd'hui plusieurs gènes dont l'activité est régulée par l'acide rétinoïque et les rétinoïdes de synthèse. Les produits de ces gènes appartiennent à différents groupes de protéines fonctionnelles parmi lesquelles des protéines de structure, des protéines associées à la croissance et à la différenciation cellulaire, des facteurs transcriptionnels ou des molécules de signalisation cellulaire. Parmi ces gènes, on cite essentiellement les gènes Hox. Ces gènes sont responsables, via des gradients d'expression, de l'établissement du plan antéro-postérieur de développement chez les vertébrés et contrôlent l'expression d'autres gènes (Marshall et al., 1996).

Les voies de régulation de l'acide rétinoïque sont régies par ses différents récepteurs de l'acide rétinoïque et aussi par différentes protéines, qui peuvent interagir ou entrer en compétition avec les récepteurs de l'acide rétinoïque (Meyer et al., 1989). Plusieurs facteurs contribuent à la multiplicité des voies des rétinoïdes. La disponibilité physiologique des rétinoïdes est un facteur très important, puisqu'elle est nécessaire à la formation d'un dimère actif (Figure.4).

Les actions de RAR et de RXR sur la transcription de gènes exigent une interaction étroitement coordonnée avec un grand nombre de cofacteurs: des coactivateurs et de corépresseurs. Les cofacteurs sont connus pour interagir avec RAR et RXR. Leurs mécanismes d'action incluent la modification de la chromatine et le recrutement de facteurs de base de la transcription (Wei, 2003). En effet, l'hétérodimère, RAR:RXR se lie à la chromatine à la surface d'un nucléosome et facilite la formation de la structure répressive de la chromatine en recrutant des

corépresseurs. Ceci se passe en absence de ligand (Xu et al., 1999). Deux corépresseurs sont particulièrement importants : ce sont le NCoR (Nuclear Receptor Corepressor) (Kurokawa et al., 1995) et son homologue SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Receptor). Les deux interagissent avec les RAR en absence de ligand et cette interaction implique la région D située entre le domaine de liaison à l'ADN (DLA) et le domaine de liaison au ligand (DLL). Des mutations dans la région D empêchent l'interaction entre RAR et NCoR et, par conséquent, empêchent la répression de la transcription.

Des études récentes ont essayé de tracer la surface d'interaction des cofacteurs avec les récepteurs. On a proposé l'existence d'un motif riche en leucine qui est "LXXLL" (où L = leucine) pour les familles du coactivateur p160 et un motif relié "L/IXXI/VI" pour certains corépresseurs tels que le NCoR et le SMRT. SRC-1 est un coactivateur de la famille des coactivateurs des récepteurs stéroïdes, qui est un récepteur nucléaire comme le récepteur à l'acide rétinoïque. Des études ont révélé que SRC-1 contenait une activité histone acétyltransférase (HAT) intrinsèque. Ceci a fourni une première preuve pour le rôle du coactivateur d'un récepteur nucléaire d'hormone dans la modification de la chromatine en facilitant l'acétylation des protéines histones, soit en ouvrant la chromatine et en provoquant la formation d'un complexe stable de pré-initiation (Wei, 2003).

Les corépresseurs attirent un complexe contenant Sin3 (homologue du répresseur transcriptionnel de la levure Sin3p), des déacétylases des histones (HDAC 1 et 2), ainsi que plusieurs autres protéines dont le rôle est encore obscur (Chen et Evans, 1995; Horlein et al., 1995). Lorsque ce complexe est recruté à proximité de l'ADN,

cela crée un domaine désacétylé, couvrant un à deux nucléosomes (Kadosh et Struhl, 1998). La désacétylation des histones favorise la structure compacte des nucléosomes, ce qui cause une répression de la transcription *in vivo*. Ainsi, l'interaction des récepteurs nucléaires avec des corépresseurs n'inhibe pas directement la transcription, mais crée plutôt un domaine localisé de répression qui diminue indirectement la transcription par l'ARN polymérase II.

La liaison du ligand cause un changement conformationnel de l'hétérodimère RAR:RXR, la dissociation des corépresseurs et la liaison des coactivateurs. Ces derniers incluent une famille de protéines appelées coactivateurs p160 qui ont été identifiées grâce à leur liaison au domaine de transactivation AF-2 (Kurokawa et al., 1995).

L'interaction entre CBP/p300 (qui est un intégrateur transcriptionnel impliqué dans la signalisation via des facteurs de transcription) avec les récepteurs RAR implique le domaine de transactivation AF-2 et dépend de la liaison du ligand (Chakravarti et al., 1996). Plusieurs résultats supportent le rôle de CBP/p300 dans l'activation transcriptionnelle impliquant des RAR.

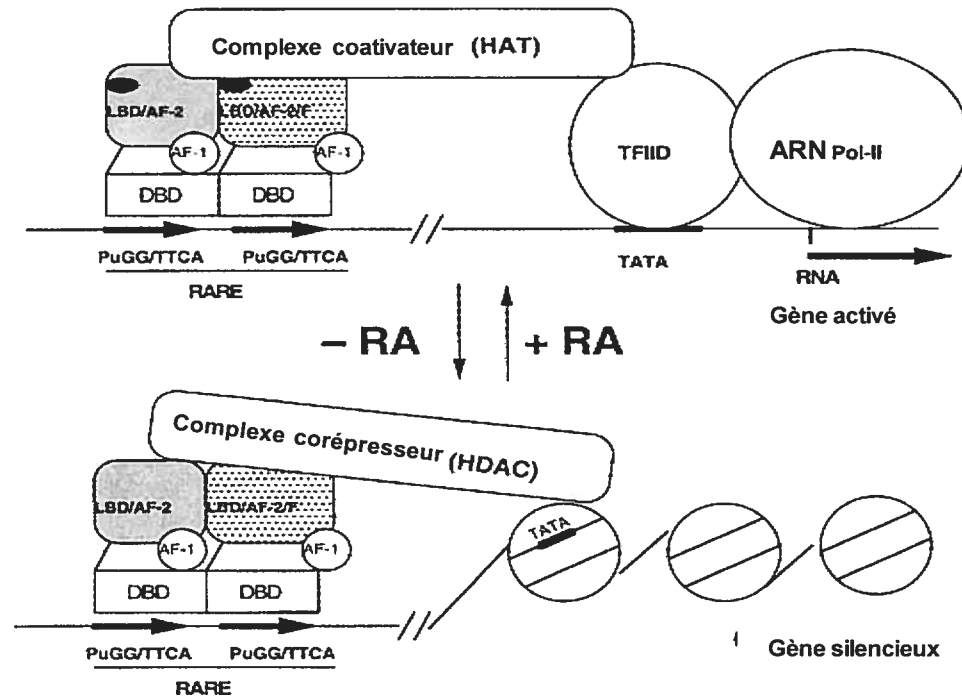


Fig.4: Schéma de la régulation de la transcription par le récepteur rétinolique (d'après Wei, 2003).

I.4 Rôle de l'acide rétinolique dans le développement

Durant l'embryogenèse, l'information codée dans le génome se traduit par la prolifération des cellules, la morphogenèse et les étapes premières de différenciation. Le modèle embryonnaire résulte du règlement et de la coordination spatiale et temporelle de ces événements (Gudas, 1994). La vitamine A (rétinol) et son dérivé, l'acide rétinolique, sont essentiels pour le développement normal. Les embryons de mammifères sont protégés contre le manque de vitamine A par une homéostasie qui permet de régler les concentrations de rétinolides. Le manque de

vitamine A a pour résultat un ensemble de malformations congénitales, y compris des défauts dans la formation de l'œil, des poumons, du système cardiovasculaire, et du système urogénital. Dans les cas extrêmes il peut y avoir aussi des anomalies de des pattes avant et de la face fendue, mais, dans ces cas-là, les embryons ne sont pas viables. Des anomalies similaires sont observées chez les embryons de souris manquant de récepteurs rétinoïques. Plusieurs études ont suggéré que le dérivé actif de la vitamine A, l'acide rétinoïque, est important pour le développement des mammifères, surtout au cours des stades embryonnaires (Conlon, 1995).

La synthèse et le métabolisme de l'acide rétinoïque pourraient impliquer les protéines de liaison cytoplasmiques, mais l'observation de mutants n'exprimant pas ces protéines montre qu'ils sont à peu près normaux. Ceci suggère que ces protéines de liaison ne sont pas essentielles.

I.4.1 Carence et excès en acide rétinoïque

Les premières études visant à comprendre la fonction de la vitamine A employaient des animaux DVA (déficients en vitamine A) ou des animaux traités avec des doses pharmacologiques d'acide rétinoïque. Des études de déficience ont montré que la vitamine A est indispensable pour la survie, la croissance, la reproduction, la vision ainsi que pour le maintien de nombreux tissus. Plus précisément, le syndrome de déficience postnatale est caractérisé par une métaplasie squameuse de plusieurs couches épithéliales, une dégénérescence des tubules séminifères et des photorécepteurs. À l'exception de cette dernière, toutes les autres malformations peuvent être prévenues par l'administration d'acide rétinoïque

(Chambon, 1994). Les souris exposées à la déficience au cours de l'embryogenèse présentent plusieurs malformations congénitales, des défauts du système respiratoire, urogénital et cardiovasculaire ainsi que des malformations oculaires, constituant les anomalies les plus importantes (Gudas, 1994).

Des doses pharmacologiques d'acide rétinoïque ont été utilisées afin d'identifier des structures qui lui sont sensibles, donc celles qui pourraient éventuellement en être la cible physiologique. L'effet d'un excès d'acide rétinoïque dépend de la concentration à laquelle l'embryon est exposé et du stade embryonnaire où le traitement est effectué. Des doses faibles de l'ordre de 10mg/kg du poids maternel induisent des malformations telles que des transformations homéotiques, tandis que de fortes doses de 100mg/kg du poids maternel affectent presque tous les systèmes en développement. La gastrulation et l'organogenèse constituent des périodes de sensibilité accrue au traitement à l'acide rétinoïque (Collins et Mao, 1999). Plus de 40 différentes malformations spécifiques peuvent être induites chez l'embryon de hamster par des traitements à l'acide rétinoïque séparés par des périodes aussi courtes que six heures (Shenefelt, 1972). Par exemple, selon le stade embryonnaire, l'acide rétinoïque perturbe les cellules de la crête neurale, ce qui induit des malformations cranio faciales, thymiques et cardiovasculaires (Collins et Mao, 1999).

Le mécanisme tératogène qui est à la base de cette embryopathie est encore peu connu. L'effet d'une dose excessive d'acide rétinoïque peut être dépendant ou non des récepteurs nucléaires. Le mécanisme d'action indépendant des récepteurs consiste par exemple en une modification de l'état de phosphorylation cellulaire, ce

qui peut mener à la nécrose (Kitabayashi et al., 1994). Lorsque la tératogénie implique des récepteurs nucléaires, le niveau de transcription de plusieurs gènes cibles de l'acide rétinoïque peut être altéré, ce qui mène à un développement anormal. Le nombre de gènes dont l'expression est modulée par le traitement avec l'acide rétinoïque dépasse 200 et on en découvre d'autres régulièrement (Gudas, 1994; Clagett-Dame et Plum, 1997). Les processus suivants peuvent être affectés via l'activation des récepteurs nucléaires: apoptose, morphogenèse, différenciation, migration, prolifération et inflammation (Leber et Denburg, 1997 ; Takada et al., 1997).

Souvent, les mêmes anomalies congénitales sont observées dans une situation de déficience ou d'excès d'acide rétinoïque. On propose deux explications à ce phénomène. La manipulation de la concentration de l'acide rétinoïque peut, ou bien affecter les mécanismes qui se retrouvent à la base du même processus, ou bien perturber deux événements distincts qui mènent à des malformations similaires. Par exemple, dans le cas d'excès et d'insuffisance, on observe des malformations des arcs aortiques (Shenefelt, 1972 ; Wilson et al., 1953).

I.4.2 Rôle de l'acide rétinoïque dans la reproduction et à différents stades embryonnaires

On a montré que la production d'acide rétinoïque par l'enzyme rétinaldéhyde déshydrogénase-2 (Raldh2) est requise pour la survie des embryons de souris et pour la poursuite de la morphogenèse. Raldh2 est une aldéhyde-déshydrogénase NAD-dépendante avec une haute spécificité pour le substrat du rétinaldéhyde (Zhao

et al., 1996). Son modèle d'expression pendant le développement de la souris a suggéré qu'elle peut être responsable de la synthèse embryonnaire de l'acide rétinoïque. Une interruption ciblée du fonctionnement du gène *Raldh2* cause la mort des embryons de souris à mi-gestation sans subir la rotation axiale (Niederreither et al., 1999). Ces mêmes embryons montrent un raccourcissement le long de l'axe antéropostérieur et une absence de formation de bourgeons des membres. Leur cœur consiste en une seule cavité, médiane et dilatée. Leur région fronto nasale est tronquée. Ces défauts résultent d'un blocage de la synthèse de l'acide rétinoïque embryonnaire. Ces données suggèrent que l'acide rétinoïque synthétisé au cours de la post-implantation des embryons de mammifère est une hormone développementale essentielle, dont le manque mène à la mort précoce des embryons (Niederreither et al., 1999).

Le rétinol et ses métabolites, l'acide rétinoïque trans et l'acide rétinoïque 9 cis, sont des régulateurs cellulaires de la croissance, de la différenciation et du développement. Ils ont été impliqués dans la folliculogenèse ovarienne et la survie embryonnaire. Des expériences ont été effectuées pour identifier les effets du traitement au rétinoïde chez des brebis ayant subi une superovulation. Le développement embryonnaire a été suivi in vitro. Les embryons des animaux traités avaient un indice de formation de blastocystes plus élevé (Eberhardt et al., 1999). En effet, la majorité des embryons (60% vs 6%) de brebis témoins ne se sont pas développés au delà du stade de 8 cellules, par comparaison avec les animaux traités. Le traitement à l'acide rétinoïque, chez les brebis qui subissent une superovulation,

augmente la viabilité embryonnaire et influence le développement embryonnaire (Eberhardt et al., 1999).

I.4.3 L'acide rétinoïque et le cancer

Il a été démontré que le processus de transformation maligne est supprimé par l'action directe des rétinoïdes sur les cellules néoplasiques. Cette transformation maligne peut être induite par des agents chimiques, viraux ou physiques (Roberts et Sporn, 1984). Ces résultats peuvent être attribués à l'inhibition de la croissance, à l'induction de la différenciation terminale et à la prévention de l'action des promoteurs tumoraux par les rétinoïdes. Le clonage des récepteurs de l'acide rétinoïque a permis de fournir des preuves sur leur rôle dans le développement des tumeurs humaines puisque ce sont les principaux médiateurs des effets de l'acide rétinoïque. On a commencé à identifier un rôle direct pour ces récepteurs dans le développement des tumeurs humaines par la surexpression d'un allèle normal de $RAR\alpha$ dans des cellules leucémiques ayant une translocation entre les chromosomes 15 et 17 t(15:17) (cette mutation entraîne la fusion de $RAR\alpha$ avec une protéine nucléaire, PML). Cette surexpression cause une réduction de la vitesse de croissance et permet l'expression de plusieurs marqueurs de maturation des cellules myéloïdes (Ahn et al., 1995). Ce type de translocation se produit dans la plupart des cas de leucémie. En exprimant le produit de fusion PML- $RAR\alpha$ chez les souris transgéniques on constate que cette protéine est impliquée dans le développement des leucémies (Brown et al., 1997). Lorsque le gène est surexprimé dans une lignée de fibroblastes et qu'on infecte les cellules avec le virus du

polyome, on observe moins de foyers de transformation pour la lignée surexprimant le récepteur de l'acide rétinoïque que pour la lignée normale. La présence de RAR α dans ces cellules baisse leur sensibilité à la transformation, par l'acide rétinoïque, d'environ 100 fois (Talmage et Lackey, 1992). Ceci confirme que RAR α peut supprimer la transformation cellulaire induite par le virus du polyome. Par exemple, lorsqu'on surexprime RAR α dans les cellules transformées par l'oncogène v-MYB, on remarque la différenciation des cellules en réponse à l'acide rétinoïque (Smarda et al., 1995). Cette différenciation ne se fait pas sans l'introduction d'un récepteur RAR. Lorsqu'elle est excessive, cette différenciation mène à l'apparition d'une tumeur. Cet exemple démontre que l'expression de RAR α pourrait supprimer la transformation cellulaire par l'oncogène v-MYB.

Il existe une multitude d'autres exemples qui confirment ces résultats. Ces exemples supportent l'hypothèse de l'intervention de l'acide rétinoïque en ralentissant les transformations malignes.

I.4.4 Rôle dans le développement de la moelle épinière et des motoneurones

L'étude des modèles d'expression des gènes a permis de comprendre certains des mécanismes neuronaux fondamentaux. Des études fonctionnelles montrent que les gènes homéotiques coordonnent la formation du patron de l'axe antéropostérieur, en établissant l'axe de la région tête-queue. Dans le cerveau postérieur, les gènes Hox codent l'identité des rhombomères. Les gènes En confèrent la polarité de l'axe antéropostérieur du tectum optique, qui est cruciale à la formation de la carte rétinotopique (Squire et al., 1998).

Les gènes homéotiques et d'autres gènes classés comme médiateurs transcriptionnels règlent la position spécifique du développement. Dans le cas des gènes Hox, un gradient de signalisation de l'acide rétinoïque joue le rôle de signal de position (Carpenter, 2002).

Chez le jeune embryon, l'acide rétinoïque est produit par les somites qui se trouvent de part et d'autre du bulbe et de la colonne vertébrale, par l'intermédiaire de l'activité d'une enzyme Raldh synthétase. Une autre enzyme, Cyp26, exprimée au niveau du cerveau postérieur, dégrade l'acide rétinoïque. Les mutations ciblées de Raldh chez les souris et le traitement d'embryons de poussin avec un antagoniste qui bloque en particulier tous les RAR causent tous les deux l'antériorisation du cerveau postérieur (Squire et al, 1998).

On sait que la moelle épinière embryonnaire est riche en acide rétinoïque, et il y a eu plusieurs études plaidant pour l'existence d'un gradient dorsoventral de concentration d'acide rétinoïque au niveau de la moelle épinière. Par une combinaison de techniques de microdissection et de dosage, les taux d'acide rétinoïque et ceux de la RALDH ont été comparés chez les jeunes embryons et les souris postnatales. Il a été remarqué que les taux d'acide rétinoïque et de la RALDH varient de façon similaire (McCaffery et Dräger, 1994).

On a pu observer aussi que la synthèse générale de l'acide rétinoïque diminue avec l'âge. Il a été observé qu'il n'y avait aucune différence dorso ventrale de concentration d'acide rétinoïque sur une bonne partie de la moelle épinière. Cependant, au niveau de deux renflements, la synthèse ventrale dépasse la synthèse dorsale dans les premiers stades développementaux: jeunes embryons.

Ces endroits où il y a des différences de concentrations sont qualifiés de points chauds et sont à l'origine de l'innervation des membres. La différence de concentration est plus importante pendant les premières étapes de l'innervation des membres et disparaît lentement par la suite. Les points chauds de synthèse vont créer des auréoles de diffusion d'acide rétinoïque, qui peuvent influencer la survie des neurones dans les régions de la moelle épinière qui à partir desquels l'innervation des membres en développement (McCaffery et Dräger, 1994).

D'autre part, des études ont révélé que l'interaction de l'acide rétinoïque avec d'autres facteurs comme le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) règle la progression des cellules et permet la spécification de types particuliers de motoneurones de la moelle épinière durant les différentes phases de développement (Appel et Eisen, 2003; Novitch et al., 2003).

Il a été observé aussi que l'acide rétinoïque intervient dans l'organisation des motoneurones en colonnes médianes et latérales qui innervent les muscles des membres (Appel et Eisen, 2003).

I.4.5 Évolution des récepteurs RXR/RAR

L'acide rétinoïque affecte beaucoup de caractères spécifiques chez les vertébrés et plus généralement chez les chordés. L'acide rétinoïque est aussi un morphogène très répandu chez les animaux supérieurs. Ceci n'empêche pas le fait que des récepteurs très proches de RXR aient été retrouvés chez des groupes primitifs d'invertébrés tels que les spongiaires et les cnidaires.

Chez les spongiaires *Ephydatia muelleri*, *Ephydatia fluviatilis* et *Spongilla lacutris*, on a pu identifier des composés de l'acide rétinoïque (Imsiecke et al., 1996). Lorsqu'on expose ces différentes espèces de spongiaires à l'acide rétinoïque, on remarque qu'il y a une modification de l'adhésion cellulaire qui suggère l'existence de récepteurs pour l'acide rétinoïque chez cet embranchement primitif.

Chez le cnidaire *Tripedalia cystophora*, on a pu cloner l'ADN d'un gène possédant une forte homologie de séquence avec celui des récepteurs de l'acide rétinoïque RXR. Le degré de similitude en acides aminés avec le récepteur humain RXR alpha est de 52%. On remarque chez *Tripedalia* que les gènes des protéines du cristallin sont fortement exprimés dans la lentille oculaire. Ces gènes sont connus chez les vertébrés comme dépendants de la signalisation des rétinoïdes. Ceci suggère qu'ils sont sous le contrôle du récepteur RXR cloné. Finalement, grâce à un anticorps contre RXR de *Tripedalia* on a montré que ce récepteur est exprimé dans tous les stades du développement sauf le stade ephydra (Kostrouch et al., 1998).

Ces données montrent que chez ces animaux diploblastiques et primitifs, le RXR existait déjà et suggère qu'il serait l'un des premiers composants des mécanismes régulateurs du développement chez les métazoaires (Kostrouch et al., 1998).

Le RAR, pour sa part, n'a été identifié que chez les chordés. Le RAR agit en médiateur. On pense que cette médiation est un événement important qui contribue à l'innovation du corps des chordés. L'aldéhyde déshydrogénase et les enzymes de dégradation de l'acide rétinoïque semblent être aussi spécifiques aux chordés. Le modèle d'expression de ces gènes chez les embryons de certains protochordés (ascidiens) est similaire à celui qu'on retrouve chez les embryons de vertébrés. Ces

résultats suggèrent que la cascade d'événements engendrée par l'acide rétinoïque a été déjà bien établie chez l'ancêtre commun des chordés. On sait aussi que l'acide rétinoïque règle la morphogenèse pendant la reproduction asexuée de ces mêmes protochordés, suggérant que l'acide rétinoïque joue aussi un rôle dans l'apparition de la diversité morphologique dans les groupes des chordés (Fujiwara et Kawamura, 2003).

Durant la discussion, nous verrons que les résultats obtenus indiquent la présence du récepteur de type RXR chez la pensée de mer. Ces résultats se joignent à plusieurs indices qui indiquent que les cnidaires sont moins différents génétiquement des humains que certains peuvent le penser. L'analyse des résultats obtenus nécessite une mise en contexte par la description générale de nos modèles expérimentaux : la pensée de mer et *Acropora*.

I.5 Modèles expérimentaux : *Renilla koellikeri* et *Acropora millepora*

I.5.1 Organisation morphologique de la pensée de mer et d'*Acropora*

La pensée de mer *Renilla koellikeri* est un cnidaire anthozoaire appartenant à la classe des octocoralliaires. Elle vit dans les eaux du littoral de la côte est de l'Amérique du nord et se reproduit pendant le mois de Juin. C'est un animal colonial qui se présente sous forme d'un rein aplati avec une symétrie bilatérale (Wilson, 1882). La rigidité de la colonie et sa couleur violette viennent des spicules de carbonate de calcium qui font partie de la composition des tissus de la rénille.

La colonie est formée de polypes qui se trouvent sur la face dorsale et des propriétés communes comme la rétraction dans le rachis en cas de danger. Il y a deux sortes de polypes : les autozoïdes et les siphonozoïdes (figure.5).

Les autozoïdes possèdent huit septums et huit tentacules. Ce sont des polypes qui assurent plusieurs fonctions dont l'alimentation et la reproduction. Les autozoïdes secrètent un mucus collant afin de piéger des organismes planctoniques et les déchets organiques suspendus dans l'eau. A la saison de reproduction qui correspond généralement à la période entre début Mai et fin Juin, ils libèrent les gamètes.

Les siphonozoïdes sont des zooïdes réduits sans tentacules, dotés d'un septum réduit et n'ont pas de filaments septaux. Ils sont divisés en deux catégories: un seul siphonozoïde constitue une soupape de sortie qui relâche l'eau et permet de dégonfler la colonie, tous les autres sont groupés en petits points blancs et se trouvent entre les autozoïdes. Ils servent de pompes pour augmenter le volume de la colonie lorsqu'elle est dégonflée.

Le pédoncule se trouve sur la face ventrale. Son diamètre peut aller jusqu'à 5cm. Il est perpendiculaire au rachis ce qui lui permet de s'ancrer dans le substrat par un mouvement péristaltique. Ce pédoncule peut être distendu pour améliorer l'ancrage de la colonie dans le substrat. Sous l'effet des courants marins, la pensée de mer se trouve parfois enfoncée dans le substrat, les mouvements péristaltiques au niveau du pédoncule lui permettent alors d'émerger. Ces mêmes mouvements péristaltiques lui permettent de se diriger en se laissant emporter par les courants marins (Kastendiek, 1975).

La pensée de mer est un animal bioluminescent. Elle émet de la lumière quand elle est stimulée mécaniquement. Cette émission de lumière est due à une Protéine Fluorescente Verte (GFP).

Le corail *Acropora* est aussi un anthozoaire colonial, c'est un hexacoralliaire : ses polypes sont pourvus de six tentacules ou bien des multiples de six. Ce corail présente beaucoup de similarités histologiques avec la pensée de mer. La principale différence entre ces deux animaux réside dans le nombre supérieur de mésentères chez *Acropora*. Les polypes d'alimentation se présentent de la même façon que pour la pensée de mer, c'est à dire comme des colonnes reliées ensemble avec une couronne de tentacules. Ces tentacules irradiant à partir d'un disque oral à leur extrémité distale libre.

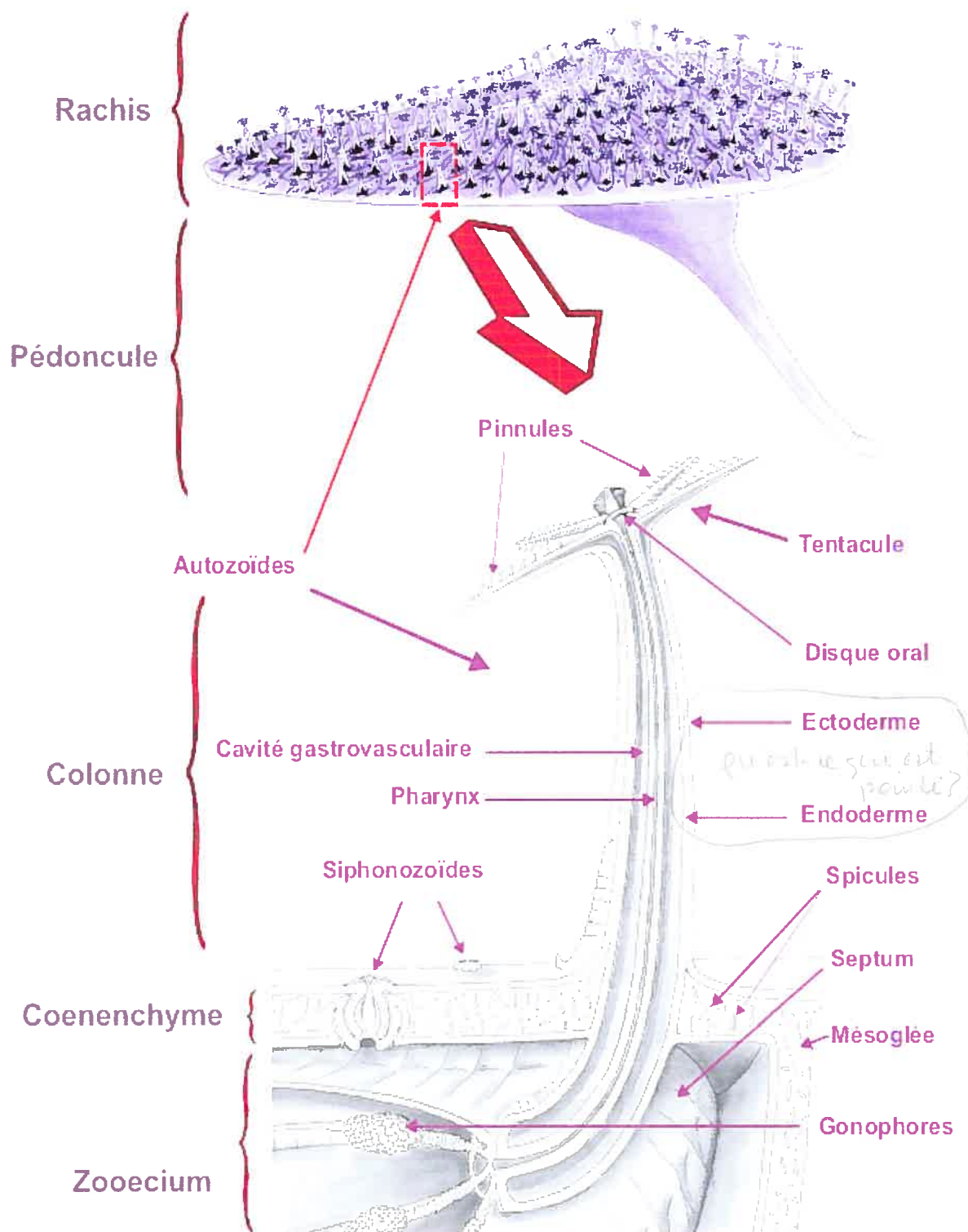


Fig.5 : Dessin détaillé d'une colonie de *Renilla koellikeri*. Gracieuseté de Vincent

Pernet

I.5.2 Organisation histologique

La pensée de mer est un cnidaire diploblastique, donc formé de deux couches de tissus, l'ectoderme et l'endoderme. Entre ces deux couches s'insère une couche de gelée contenant des fibres conjonctives: la mésoglée.

I.5.2.1 L'ectoderme

L'ectoderme enveloppe les tissus de la pensée de mer au niveau de différentes structures: le rachis, les autozoïdes et les siphonozoïdes. Au niveau du rachis, l'ectoderme est composé de coenchyme où sont insérés les autozoïdes et les siphonozoïdes. L'épiderme enveloppe le coenchyme du rachis mais aussi celui des autozoïdes et du pédoncule.

L'ectoderme a une épaisseur de 15 à 25 μm . Il est constitué essentiellement de longues et fines cellules avec un noyau situé dans la moitié inférieure du cytoplasme. Les cellules ont 6 à 10 μm de large et 15 à 30 μm de long. Ces cellules se situent à la surface juste sous la cuticule. D'autres cellules qui se situent juste en dessous s'amincissent en donnant des pseudopodes qui permettent leur ancrage à la mésoglée. L'épiderme contient également deux types de cellules glandulaires. Les cellules glandulaires à mucus se trouvent sur la surface dorsale dans la région des autozoïdes et des siphonozoïdes. Leur largeur est de 10 à 16 μm , leur longueur de 15 à 30 μm . Le noyau est petit et poussé à la périphérie. Le cytoplasme contient du mucus. L'autre type des cellules glandulaires consiste en cellules qui se trouvent dans l'épiderme du rachis et qui possèdent un cytoplasme granulaire acidophile. Ces cellules sont de plus grande taille, avec une largeur de 8 à 16 μm et une longueur de 12 à 20 μm . Elles sont de forme rectangulaire ou ovale. Il existe aussi

des cellules sensorielles de différentes formes uni, bi ou multipolaires plus abondantes près de la mésoglée.

Les cellules interstitielles sont peu fréquentes dans l'épiderme du rachis. Ce sont de petites cellules irrégulières près de la base d'autres cellules de l'ectoderme.

Les cnidoblastes sont de petites cellules urticantes localisées au niveau des tentacules des autozoïdes; elles se retrouvent avec une densité moindre au niveau du rachis et des polypes secondaires (Lyke, 1965).

Les cellules épithelio musculaires sont localisées au niveau des tentacules et du disque oral des autozoïdes mais sont absentes au niveau de l'ectoderme du rachis (Chevalier et al., 1987).

I.5.2.2 La mésoglée

La majeure partie du coenchyme est constituée par la mésoglée. La mésoglée est un tissu amorphe et fibreux constituant des amœbocytes et des cellules à spicules dispersées. La mésoglée, qui est de nature collagèneuse, contient essentiellement des spicules, des amœbocytes et des cellules nerveuses. Il y a beaucoup de spicules au niveau de la mésoglée du rachis aussi bien sur la face ventrale que sur la face dorsale. Aux endroits de la jonction avec les siphonozoïdes et les autozoïdes, la mésoglée est plus fine et sans spicules.

Les spicules supportent la majeure partie du rachis et contribuent également à la couleur de la colonie. La taille des spicules est variable, de l'ordre de 167 à 556 μm de longueur et de 20 à 40 μm de largeur. Les couleurs des spicules varient entre les

différents tons du violet. Les spicules sont disposées parallèlement dans la mésoglée.

Les amœbocytes sont des groupes de cellules de nature mésenchymateuse qui forment un complexe intra mésogléal, mais peuvent être présents également sous forme de cellules individuelles. Ils sont disposés de manière aléatoire dans la mésoglée. Les amœbocytes individuels ont une apparence amœboïde avec des longues extensions cytoplasmiques (Lyke, 1965).

I.5.2.3 L'endoderme

L'endoderme est aussi appelé gastroderme. Son épaisseur est de l'ordre de 3 à 24 μm . La majeure partie du gastroderme est constituée de cellules épithéliales. L'endoderme contient aussi d'autres types de cellules, comme les cellules épithéliales musculaires, des cellules sensorielles, les cellules nerveuses, les cellules lumineuses, digestives et glandulaires. On y retrouve également des cellules reproductrices.

Les cellules reproductrices sont retrouvées dans la cavité gastrovasculaire au niveau des filaments mésentériques. Quant aux cellules lumineuses, on les retrouve essentiellement dans la paroi de la colonne à la base des autozoïdes, mais elles se retrouvent également dans les siphonozoïdes et au niveau du disque oral (Lyke, 1965).

I.5.3 Description du système nerveux des cnidaires anthozoaires

Ces animaux représentent des modèles intéressants puisqu'ils appartiennent à un embranchement qui existe depuis environ 700 millions d'années, et ils sont dotés d'un des systèmes nerveux les plus anciens.

Le système nerveux des cnidaires anthozoaires, tel qu'examiné d'abord chez les anémones de mer, est constitué de quelques types de cellules comme les neurones sensoriels et les cellules ganglionnaires. L'étude de l'organisation générale du réseau nerveux montre que ce réseau est tantôt dense, formant un plexus nerveux, tantôt lâche et clairsemé, allant même jusqu'à être constitué, dans certains endroits, par des neurones isolés (Figure.6). Ce réseau montre une différence considérable dans la densité de l'innervation selon les régions. Les muscles rétracteurs sont innervés par une forte densité de neurones à l'inverse des muscles à conduction lente qui, sont contrôlés par un nombre moindre de neurones (Batham et Robson, 1960). Au niveau de l'ectoderme on remarque l'existence d'un réseau lâche d'innervation qui devient dense lorsque cet ectoderme se replie dans la cavité gastrovasculaire pour former le plexus pharyngien.

En ce qui concerne la pensée de mer, plusieurs types de neurones interconnectés constituent le plexus nerveux au niveau des différentes couches cellulaires (Figure.7). Grâce à une étude immunohistochimique des cellules à sérotonine, on a pu identifier un plexus nerveux au niveau de l'ectoderme (Umbriaco et al., 1990). D'autres travaux, visant à localiser les neurones à norépinephrine révèlent que les cellules immunoréactives dans ce cas forment un plexus nerveux au niveau de la mésogée impliquant deux types de cellules: des neurones et les

amoebocytes, plexus s'étendant au rachis et au pédoncule (Pani et al., 1995; Pernet et al., 2004). Des neurones peptidergiques ont été visualisés par immunohistochimie chez la pensée de mer : ce sont les neurones à antho-RFamide. Ils sont présents partout dans le polype de la colonie et dans le rachis et au niveau des différentes couches tissulaires (Pernet et al., 2004). Un réseau lâche de neurones à antho RFamide a été identifié au niveau des tentacules des autozoïdes, ce réseau se prolonge au niveau du disque oral et du pharynx où il devient plus dense. A tous les niveaux de ce réseau, les neurones projettent des prolongements qui s'étendent jusqu'au plexus basiectodermal. On note une innervation continue au niveau du basiectoderme des tentacules, du disque oral et du pharynx. Au niveau de l'endoderme et des autozoïdes, les neurones sont peu nombreux et ne forment pas de réseau. Même s'il n'y a pas de connexions visibles entre ces différents neurones, ceci ne veut pas dire qu'ils ne sont pas interconnectés (le relais peut se faire par des neurones qui ne sont pas à antho-RFamide).

Les cellules nerveuses qui constituent ce réseau d'innervation dérivent des cellules interstitielles. En effet, les cellules interstitielles sont à l'origine de plusieurs types de cellules dont les cellules sensorielles. Les cellules interstitielles constituent une population multipotente de cellules souches et ont une forme arrondie (Bode, 1996). Elles se retrouvent exclusivement au niveau de l'ectoderme basal.

Toutes ces données soutiennent l'existence d'un système nerveux composé de plusieurs types de neurones chez la pensée de mer.

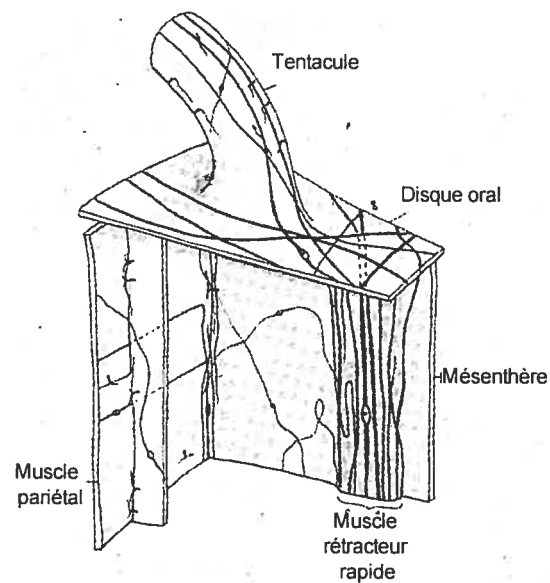


Figure.6 : Représentation schématique de l'innervation d'une portion de l'anémone de mer *Mimetridium cryptum*. On note la présence de neurones individuels parcourant le muscle pariétal vers les mésentères, des mésentères vers l'ectoderme du disque oral, puis du disque oral vers le tentacule. (d'après Batham, 1965)

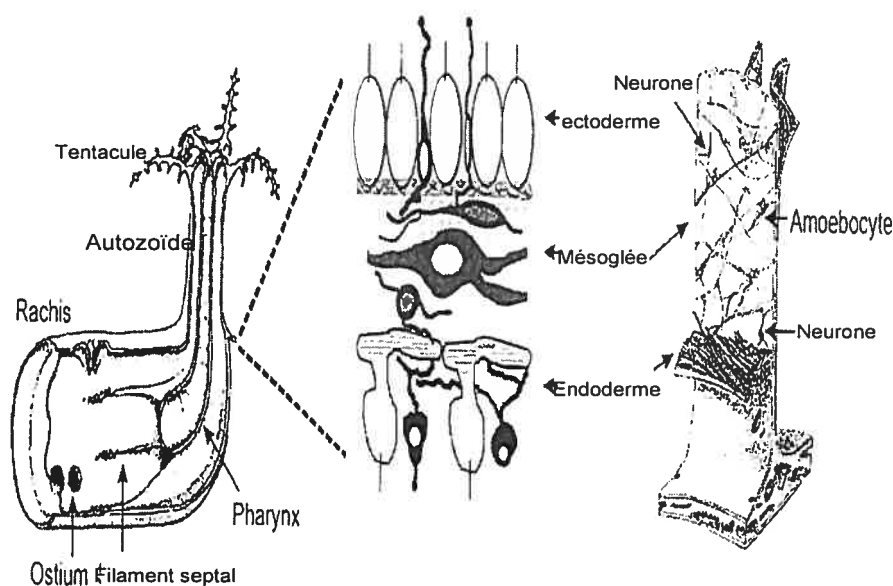


Figure.7: A gauche: schémas illustrant l'organisation générale de la pensée de mer. Au centre: l'organisation histologique du rachis ventral révèle la distribution des neurones immunoréactifs (en noir). On note la présence de deux types de neurones: bipolaire et tripolaire. A droite: schéma représentatif d'une partie du zooecium, le détail de la mésoglée révèle son innervation. (Schémas repris d'après Anctil et al 2002, Tiré de Buisson et Franc, 1969 et de Case, 1979).

I.6 Hypothèse et objectif du travail

Plusieurs études ont porté sur l'existence de récepteurs nucléaires chez les cnidaires et les spongiaires. Le clonage de certains récepteurs nucléaires chez *A. millepora* suggère que certains récepteurs sont anciens du point de vue évolutif. Parmi ces récepteurs l'AMNR8, qui est un récepteur nucléaire cloné chez *Acropora* qui présente une forte ressemblance avec RXR (Grasso et al., 2001). Une étude bibliographique révèle que chez quelques spongiaires, on a pu identifier un effet de l'acide rétinoïque (Imsiecke et al., 1996). Lorsqu'on expose ces différentes espèces de spongiaires à l'acide rétinoïque, on remarque qu'il y a une modification de l'adhésion cellulaire. Le clonage du récepteur rétinoïque chez le spongiaire *Suberites domuncula* démontre son existence chez cette espèce, où l'on a aussi démontré que l'acide rétinoïque exerce une régulation positive sur le récepteur RXR (Wiens et al., 2003). Les travaux de Kostrouch et al (1998) chez le cnidaire *Tripedalia cystophora* ont abouti au clonage de l'ADN provenant d'un gène possédant une forte homologie de séquence avec celui des récepteurs de l'acide rétinoïque RXR. L'identité en acides aminés avec le récepteur humain RXR alpha est de 52%. On remarque chez *Tripedalia*, que les gènes du cristallin, qui sont connus chez les vertébrés comme dépendants de la signalisation des rétinoïdes, sont extrêmement exprimés dans la lentille oculaire. Ceci permet de croire que les gènes du cristallin chez *Tripedalia* sont sous le contrôle du récepteur RXR cloné. Finalement, grâce à un anticorps dirigé contre RXR on a montré que ce récepteur est exprimé dans tous les stades du développement de *Tripedalia cystophora*, sauf le stade ephydra (Kostrouch et al., 1998). Étant donné l'importance de ces

récepteurs impliqués essentiellement dans le développement, leur étude chez la pensée de mer est intéressante.

L'élaboration de ce projet a été encouragée par la forte conservation de la séquence de RXR entre le cnidaire *Tripedalia* et l'humain, ce qui rend probable que l'anti-RXR humain reconnaisse un analogue au récepteur RXR chez la pensée de mer.

Cette étude pourrait nous renseigner sur l'origine et l'évolution de ces récepteurs alors que leur localisation pourrait nous donner une idée sur leur rôle chez ces cnidaires. Nous avons procédé à l'investigation de ce récepteur au moyen de deux techniques immunologiques: l'immunobuvardage, qui permet de déterminer la présence de ce récepteur chez la pensée de mer, et l'immunohistochimie, qui permet de localiser potentiellement les cibles fonctionnelles de ce récepteur dans les tissus, ce qui pourrait donner une idée sur le rôle du récepteur chez la pensée de mer et chez *Acropora*. Étant donné l'action développementale de l'acide rétinoïque, nous nous attendons à ce que cette protéine soit exprimée à différents stades cellulaires, et nous nous attendons à la retrouver impliquée dans le maintien de l'état différencié.

Chapitre II

Article

Article: Bouzaiene M, Angers A, Anctil M. (2006). Évidence de la présence d'un récepteur de type RXR chez deux cnidaires anthozoaires (en phase finale de préparation). Sera soumis à Invertebrate Neuroscience.

Contribution de l'étudiant à l'article: L'idée originale du projet a été proposée par Michel Anctil. Les expériences concernant *Renilla koellikeri* et leur analyse ont été effectuées par Meriem Bouzaiene co-dirigée par Annie Angers et Michel Anctil. Les expériences concernant *Acropora millepora* ont été faites par Michel Anctil et leur analyse par Meriem Bouzaiene. L'article a été rédigé par Meriem Bouzaiene sous la direction de Michel Anctil.

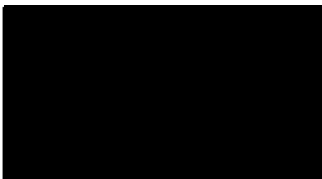
ACCORD DES COAUTEURS

Bouzaïene Meriem, [REDACTED]
M.Sc. Sciences biologiques- 2-235-1-0. Département de sciences biologiques

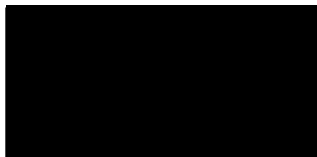
Article: Bouzaïene M, Angers A, Anctil M. (2006). Evidence for the presence of a retinoic acid-like receptor in two colonial anthozoans (Cnidaria).(en phase finale de préparation). Sera soumis à Invertebrate Neuroscience.

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Meriem Bouzaïene** inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Recherche par immunobuvardage et immunohistochimie d'un récepteur de type RXR chez deux cnidaires anthozoaires.

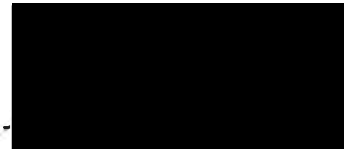
Signatures des coauteurs



Meriem Bouzaïene



Annie Angers



Michel Anctil

Date:

**Evidence for the presence of a retinoic acid-like receptor in two
colonial anthozoans (Cnidaria)**

BOUZAIENE, M., ANGERS, A., ANCTIL, M.


Département de sciences biologiques, Université de Montréal, C.P.6128, Succursale
Centre-Ville, Montréal, Qué., Canada H3C 3J7

Address for correspondence :

Dr Michel Anctil, Département de sciences biologiques, Université de Montréal,
C.P.6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

Tel : (514) 343-7691

Fax : (514) 343-2293



Abstract

Retinoic acid is known to induce vertebrate stem cells to differentiate into a variety of cell types, including neurons. Although retinoic acid was reported to affect morphogenetic pattern specification in the hydrozoan *Hydractinia* (Müller, 1984) and a retinoid RXR receptor was cloned in the jellyfish *Tripedalia* (Kostrouch et al. 1998), the cellular targets of retinoids were not investigated. We used Western immunoblotting and immunohistochemistry to investigate the presence and cellular distribution of a RXR-like receptor in the sea pansy *Renilla koellikeri* and in the staghorn coral *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa). Western blots revealed a 64 KDa protein from a sea pansy extract in a band that co-migrated with a RXR protein from the rat brain. Using antibodies raised against an epitope of human alpha RXR, we visualized putative ectodermal sensory cells in the polyp column and the tentacles of the adult sea pansy. Immunoreactivity was absent in staghorn coral larvae but present in the polyp column of adult colonies in the form of clusters of neuron-like cells in the basiectoderm near the ectoderm-mesoglea interface. These observations suggest that a RXR-like receptor is involved in epithelial nerve cell specification in adult anthozoans and that this role is conserved throughout evolution.

Key words: anthozoan, cnidaria, ectoderm, western blot, immunochemistry, retinoic acid receptor, nuclear receptor

Introduction

Nuclear receptors constitute a large family of transcription factors that are widely distributed in the animal kingdom (Laudet et al. 1992). The cloning of several nuclear receptors in the coral *Acropora millepora* (Grasso et al. 2001) suggests that they are evolutionarily ancient. However, their functional roles are unknown and no cognate ligand for the coral receptors has yet been identified. Although no steroid receptor was among the cloned nuclear receptors in corals, sex steroids such as estrogens have been reported in corals and other cnidarians (Tarrant et al. 1999; Pernet and Ancil 2002). The functional targets of these steroids are unknown but changes in the number of spawned eggs, skeletal growth rate and tissue thickness were reported in corals exposed to exogenous estrogens (Tarrant et al. 2004).

Nuclear receptor for which there is strong evidence in cnidarians is the retinoic X receptor RXR. As other nuclear receptors, they are transcriptional factors which are involved in the control of expression of certain genes through interactions with short sequences of the DNA present in the promoters of these genes. A significant source of the diversity of retinoic acid action comes from the existence of two families of receptors: retinoic acid receptor (RAR), which binds either all-trans and 9-cis retinoic acid, and RXR which binds only 9-cis retinoic acid (Chambon 1996). Several studies suggested that retinoic acid plays a significant role in mammalian development, especially during embryonic stages (Conlon 1995). Retinol and its

metabolites are cellular regulators of growth, differentiation, and development. It was demonstrated that retinoic acid is essential for the post-implantation survival of the mammalian embryo. Knockout mice lacking retinoic acid receptor suffer an early embryonic death, which is consistent with the promotion of embryonic viability by retinoic acid (Eberhardt et al. 1999; Niederreither et al. 1999).

Retinoic acid is also known to be involved in vertebrate neuronal development. It is reported to influence the survival of neurons in the spinal cord and promote neural plasticity (McCaffery and Dräger 1994; Misner et al. 2001). Various forms of retinoic acid receptors are expressed widely in the mammalian brain (Krezel et al. 1999) and retinoic acid signalling is associated with specific neuronal precursor cells during development and in the adult brain as well (Haskell and LaMantia 2005). In the peripheral nervous system retinoic acid is known to increase the frequency of spontaneous neurotransmitter release by developing motoneurons through a non genomic effect (Liao et al. 2004).

Much less is known about retinoic acid signalling in invertebrates. The insect ortholog of RXR, *ultraspiracle*, is an orphan receptor that forms a heterodimer with the receptor for the moulting hormone ecdysone and with other nuclear receptors to modulate ligand-induced transcriptions (Yao et al. 1993; Sutherland et al. 1995; Hall and Thummel 1998; Wang et al. 1998). A similar heterodimer involving another RXR ortholog is involved also in moulting hormone signalling of nematode worms (Shea et al. 2004). In parasitic flatworms *Schistosoma mansoni* a RXR homolog was identified which appeared to be expressed constitutively throughout development (Freebern et al. 1999). In sponges, which predate the emergence of

nervous systems, retinoids appear to modify cell adhesion by modifying the extracellular matrix (Imsiecke et al. 1996). A RXR receptor was cloned from the sponge *Suberites domuncula* and retinoic acid appears to play an important role during morphogenesis in *Suberites* (Wiens et al. 2003).

It is expected that retinoic acid signalling occurs also in cnidarians, which are one step higher than sponges in complexity. Retinoids are reported to influence morphogenetic pattern specification in the polyps of the hydrozoan *Hydractinia echinata* (Müller 1984).

A RXR receptor gene displaying substantial homology with the human RXR α receptor was cloned in the jellyfish *Tripedalia cystophora* (Kostrouch et al. 1998). Radiobinding studies confirmed that the expressed jellyfish receptor binds 9-cis-retinoic acid with high affinity and immunoblots using an antibody against jellyfish RXR showed that this receptor is expressed at nearly all developmental stages of *T. cystophora* (Kostrouch et al. 1998). However, the location and identity of the tissues or cells possessing the receptor are unknown. In addition, contrary to vertebrates, none of the studies in invertebrate revealed an involvement of retinoid receptors in nerve cell specification. We took advantage of the striking homology of the jellyfish receptor with human RXR, and of a detected sequence similarity between the epitope of a human RXR α antibody and a nuclear receptor sequence in the scleractinian coral *Acropora millepora* (Grasso et al. 2001) to investigate by Western Blot the presence of a RXR-like receptor in the anthozoan *Renilla koellikeri* and by immunohistochemistry the cellular localization of this receptor in the both *R. koellikeri* and *A. millepora*.

Materials and methods

Animal maintenance

Colonies of *Renilla koellikeri* were purchased from Marinus Scientific (Long Beach, CA, USA) and kept at 16°C in filtered artificial sea water (ASW, Instant Ocean) in a 120-L tank. Sea water osmolarity was adjusted to 1100 mOsm and pH at 8. Colonies were maintained under a 12h: 12h light:dark cycle and they were kept unfed. They were processed within 3 or 4 days of their arrival. Colonies of the staghorn coral *Acropora millepora* were collected during their mass spawning event (31 October and 1 November 2004) by divers offshore of Magnetic Island (Queensland, Australia) and they were processed immediately.

Western Blot

Extraction The sea pansy colonies were cut into small pieces and homogenized with a Brinkman PT10/35 homogenizer at 4°C (4 x 20 s/each tube) in a buffer containing 10mM Tris-HCl, 1.5mM EDTA, 5mM dithiothreitol, 0.01mM molybdate, 10% glycerol and a protease inhibitor (Sigma Aldrich, P2714) diluted 1:20. The homogenates were sonicated for 4 min at 4°C at the rate of a 1-s/pulse per min using a Fischer Scientific Model 500 ultrasonic dismembrator. The homogenates were centrifuged for 60 min at 100 000 g at 4°C with a Beckman Coulter Optima 80K ultracentrifuge and the supernatants were collected. Protein contents were determined by Bradford's assay using a Biochrom LKB Novaspec spectrophotometer. The same extraction procedure was used for the rat brain (Pel Freez Biologicals, 56004-2).

Electrophoresis The extracts were prepared in homogenisation buffer, then diluted 1:2 in Laemli buffer (Bio-Rad, 16-0737, 50 μ L B-mercaptoethanol + 950 μ L Laemli buffer). The extract was then denatured by heat at 95°C for 7 min. A 10% Tris-glycine SDS-PAGE gel and a Tris/Glycine/SDS buffer (25mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% (W/V) SDS, pH 8.3) were used for electrophoresis. Wells were loaded with 25 μ L of extract (lane 1: 50 μ g rat brain extract, lane 2: 100 μ g sea pansy extract, lane 3: 150 μ g sea pansy extract) and another lane was loaded with the protein standards (Precision Plus unstained standards, Bio-Rad, 161-0363). Migration was effected for 40 min with a potential of 200 mV with a Bio-Rad Mini-Protean 3 module.

Blotting The blotting sandwich was prepared using nitrocel membranes and the run gel described above. The sandwich was soaked in a transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% v/v methanol). The transfer was performed at 4°C during 90 min with a D.C. current of 300 mA. After the transfer the nitrocel membrane was soaked in a solution containing skim milk and washing buffer (Tris 20mM NaCl, 500mM Tween 20 0.05%, pH 7.5) for 90 min at room temperature.

Immunoreactivity As primary antibodies we used an antiserum raised in rabbit against amino acid residues 256 to 268 (LNPSSPNDPVTNI) of the human RXR alpha receptor (AmProx). After blocking in PBST with skin milk, the membrane was soaked overnight at 4°C in the primary antibody diluted 1:10 in the washing buffer. The membrane was washed 5 x 10 min with washing buffer under strong agitation. After washing, the membrane was incubated in horseradish peroxidase

(HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1:10 in washing buffer (Bio-Rad, 170-5046). Another round of repeated washes with agitation followed. The membrane was then incubated during 3-5 minutes under darkness at room temperature in the luminol/pxoxyde buffer of the Bio-Rad Immun-StarTM HRP Chemiluminescent kit. Signal was detected with X-Ray films (X-OMAT Blue Film, Perkin Elmer) processed with a Konica 100plus automatic film processor.

Immunohistochemistry

Renilla koellikeri We used in total 8 specimens of *Renilla koellikeri*. Sea pansy colonies were cut into thin strips 5mm in width. The strips were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde in PBS (0.1M phosphate buffer containing 2.4% NaCl, pH 7.4). They were washed 3 x 15 min in PBS, followed by immersion in PBS containing 15% sucrose for 1 hour and 30% sucrose for 2 hours. The strips were then embedded in Shandon Cryomatrix medium and frozen in dry ice-chilled isopentane. They were stored at -84°C until used. Sections 18µm in thickness were made with a Leica CM3050 cryostat and deposited on gelatinized slides.

After drying, the sections were washed 3 x 15 min in PBS containing 0.2% Triton-X-100 (PBST). Endogenous peroxidases were inactivated by incubating slides in 1% H₂O₂ in PBST for 10 min. Non specific antigenic sites were blocked with 10% normal goat serum (NGS, Cedarlane). The primary antibodies used for Western Blots (see above) were also used for immunohistochemistry at the same dilution in PBST but for 2 h at room temperature. The sections were washed in PBST 3 x 15 min and incubated in HRP-labelled goat anti-rabbit IgG (Perkin

Elmer, NEF812) 1:200 in PBST for 1 hour at room temperature, followed by washing 3 x 15 min in PBST. Fluorescence amplification was performed with a Tyramide Signal Amplification Plus Fluorescence kit (Perkin Elmer, NEL741) during 10 minutes, followed by 3 washes with PBST of 15 min each. The specimens were mounted in glycerol 50 % PBS. The specimens were observed with a Nikon Eclipse TE300 inversed microscope equipped with a FITC filter. Images were obtained with a Nikon Coolpix 4500 digital camera and processed with Corel PHOTO-PAINT 12.

For whole mounts 10 specimens of *Renilla koellikeri* were used. Whole mounts were prepared as were the sections except that the sea pansies were first anaesthetized in 0.37M MgCl₂, and the polyps were excised and cut with fine scalpels in two symmetrical halves under microscopic control. They were not embedded in Shandon Cryomatrix.

Acropora millepora Fragments of *Acropora millepora* were immersed in sea water to which was added gradually over a period of 90 minutes an equal volume of 0.37M MgCl₂. We also used larvae. The anesthetised tips of the colony branches were broken off and immersed in 10% formaldehyde diluted in filtered sea water (pH 8) at room temperature. After 12 h in the fixative the pieces were transferred in PBS (pH 7.4) at 4°C, for 1 h, then in fresh PBS overnight still at 4°C. The crowns of 45 polyps partially exposed over the skeletal cavities were excised with fine scalpels under visual guidance with a dissecting microscope and were immersed in fresh PBS for 60 min at 4°C, in PBST containing 1% H₂O₂ for 15 min. After a short rinse in PBST the specimens were transferred to 10% NGS for 60 min at room

temperature, followed by immersion overnight at 4°C in the same primary antibody as above, diluted 1:100 in PBST and 10% NGS. The specimens were washed 3 x 60 min in PBST and were incubated during 90 min at room temperature in HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1:100 in PBST + 10% NGS. No fluorescence immunolocalization was performed because of the strong green and red background fluorescence of hard corals. After 3 rinses of 15 min each, detection was effected in diaminobenzidine 0.025% in PBS containing 0.01% H₂O₂. After washing 3 x 15 min in PBST, the specimens were mounted in glycerol 70% in PBS and were stored at -20°C. They were observed with an Olympus BX51 microscope and images were acquired with an Optronix digital camera using MagnaFire 2.0 software. Contrast was improved with Adobe Photoshop.

Controls

For the control polyps the same protocol was followed but without the primary antibody which was replaced with NGS. Specificity was also tested by western blot analysis by the manufacturer using a recombinant human RXR alpha protein as positive control. Another antiserum raised against the amino acid residues 53 to 65 (HSPISTLSSPING) of the human RXR α receptor was used but no results was obtained.

Results

Western Blot

Western blot analysis shows a band that bound the antibody against the epitope 256-268 of the human RXR α receptor at the expected molecular mass near 64Kd for both sea pansy and rat brain extracts (Fig.1). No visible band was obtained when using the antibody against the epitope 53-65 in the extract of sea pansies. The band for rat brain extract is substantially more intense than those for sea pansy extracts even though less extract was used. The amounts of extract used may account for the difference in intensity of the two sea pansy.

Immunohistochemistry

To give a contextual background for the immunochemical results, the following describes the general body plan and histological organization of anthozoans (see Lyke, 1965; Fautin and Mariscal 1991 for details). Sea pansies *Renilla koellikeri* and staghorn corals *Acropora millepora* are colonial anthozoans belonging to the orders Octocorallia (eight-tentacle polyps) and Hexacorallia (polyps with six tentacles, or multiples of six), respectively. The feeding polyps are laid out as interconnected columns with a crown of tentacles irradiating from an oral disk at their distal (free) end. The columns consist of a body wall containing two epithelial layers (ectoderm and endoderm) forming a sandwich with a jelly-like mesoglea between them. The endoderm and mesoglea extend inward at intervals to form a sheet (septum or mesentery) reaching the pharynx centrally, thereby delineating the

gastrovascular cavities (coelenteron). These cavities are continuous with those of the tentacles. The septa contain musculo-epithelial cells that form a retractor (longitudinal) muscle and a transverse (radial) muscle. The musculo-epithelial cells of the body wall endoderm and of the pharynx endoderm form the circular musculature. In addition tentacles possess ectodermal musculo-epithelial cells (Fig.2).

As with Western blots, all positive stainings were obtained with the antibody against the epitope 256-268. Only the ectodermal epithelial layer of polyps showed staining in both sea pansies and the staghorn corals. The colonial mass was devoid of staining, and no staining was apparent in polyps when the primary antibody was omitted.

Sea pansy

In whole-mounts, some of the stained cells of the body wall of the polyp column are isolated and appear slightly elongated, with their processes ending blindly toward the external surface (Fig. 3, circled), while others form patches of greater cell density and appear to be interconnected (Fig. 3, between arrows). In tentacles a similar dense cell population was also stained but, owing to the thickness and opacity of the tentacles, individual cells were more distinguishable in the pinnules at the tip of the tentacles. These cells appeared similar to the isolated cells in the column (Fig. 4, between arrows).

In sectioned material it is clear that the stained cells are localized in the ectoderm. Spanning the thickness of the ectodermal layer, these cells appear of variable thickness (Fig. 5). Although swellings appear in these cells at various

levels in the thickness of the ectodermal layer, cell bodies cannot be identified unequivocally because of the uniform staining which does not allow localization of nuclei. These cells correspond to the ectodermal sensory cells described by Lyke (1965) in sea pansies. Their length is from 6 to 25 μm and their width from 1 to 4 μm . In the colonial tissue (rachis) proximal to the polyp, fewer ectodermal cells are stained and the staining appears less intense than in the polyps (Fig. 5). No staining was observed in the rachis further away from the polyps. The stained cells are also present in the thicker ectodermal epithelium of the polyp oral disk where their shape resembles that of the stained cells in the body column (Fig.6).

Staghorn coral

In the staghorn corals the stained cells are localized in the body wall of the polyp column but not in tentacles nor in the oral disk. The stained cells possess short processes of varying thickness as in sea pansies and they are distributed in patches (Fig. 7). While many are elongated and varicose to a varying extent, others appear as rounded or oval cells with short processes or not at all (Fig. 8). Their length ranges between 3 and 9 μm and their width between 0.75 and 3 μm . Some of the cells appear to be loosely interconnected. In whole-mounts of staghorn corals with favourable viewing angles, it is clear that the immunoreactive cells, contrary to sea pansies, are located only at the base of the ectoderm, with their processes extending horizontally along the plane of the epithelial sheet (Fig. 9).

Discussion

Retinoic acid is involved in the regulation of many physiological processes associated primarily with development. We were interested in investigating whether a RXR retinoid receptor protein is present in sea pansies *R. koellikeri* with a view to eventually gain an understanding of its role in cnidarians.

Western Blot analysis allowed us to verify the presence of a RXR α -like retinoid receptor with the use of a primary antibody raised against the sequence 256-268 which is specific to the human RXR α receptor. With sea pansy extracts we visualized bands which migrated to the predicted molecular mass of the targeted protein (64 Kd). As positive control, extracts from the rat brain, in which a RXR α receptor is known to be present and to share with the human RXR α the same sequence as the epitope 256-268 (Cullingford et al. 1998), co-migrated with the sea pansy extracts (Fig.1).

The RXR α sequence fragment of this epitope is part of the conserved ligand binding domain (LBD) of the mammalian receptor. It is interesting that the nuclear receptor AmNR8 of the staghorn coral (Grasso et al. 2001), which shows homology with COUP-TF and RXR receptors, also displays 38% identity and 53% similarity with the sequence of this epitope (LNPSSPNDPVTNI *versus* LTPSSPRSVSSPL in AmNR8). However, contrary to the human RXR α , the coral sequence homologue is not part of LBD of the coral receptor but instead is inserted between the DNA binding domain (DBD) and the LBD. The epitope homology and the presence of another LNP motif elsewhere in the non-binding domain of AmNR8 are likely to

account for the recognition by the antibody of the RXR α -like protein reported here, which may not otherwise share significant homology with the human receptor. The validated antibody was then used to explore by immunohistochemistry the distribution of RXR α -like elements in sea pansy tissues.

Immunohistochemistry revealed that only one cell population was stained either in sea pansies or in staghorn corals. In both species immunoreactivity was confined to the ectoderm of polyps from mature colonies. In the case of staghorn corals for which larval material was available, no immunoreactivity was detected in the planula and post-settling stages, thus suggesting that the RXR α -like receptor is not involved in immature stages of the life cycle. Immunoreactivity in the two species was associated with different cell types presenting different distributions within the ectoderm. In sea pansies the stained ectodermal cells may vary sharply in density along the foot-head axis of the polyps. Their morphology and extension across the ectoderm layer is consistent with descriptions of ectodermal sensory neurons in the sea pansy (Lyke 1965), many of which appear to contain the native peptide Antho-RFamide (Pernet et al. 2004). On the other hand, these neurons differ from the serotonin ectodermal neurons which have relatively large, rounded or ovoid cell bodies with long processes (Umbriaco et al. 1990).

Thus it is apparent that the receptor is expressed only in one subtype of ectodermal sensory cells. While this limited expression suggests a role for retinoic acid in sensory cell specification the sea pansies, it is not clear what signalling process may be involved. Retinoic acid is known to influence position-dependent differentiation of epidermal sensory neurons in developing protochordates through

activation of specific Hox genes (Schubert et al. 2004). Position-dependent changes in nerve cell differentiation pathways occur in mature hydras along the foot-to-head axis (Bode 1992), and a similar phenomenon is suspected in mature sea pansy polyps (Umbriaco et al. 1990). As the sea pansy RXR-like receptor is expressed in mature polyps in an uneven density pattern, it is possible that retinoic acid, through the expressed sea pansy RXR-like receptor, is involved in influencing specific sensory patterning in the polyp ectoderm. It should be feasible to test this hypothesis by examining the effect of retinoic acid and antagonists on gene expression in the ectoderm of sea pansies, or of staghorn corals in which developmental genes are better known

In contrast to sea pansies, staghorn corals stained cells are found only in the column of the polyp, not in the tentacles, and they are localised exclusively at the base of the ectoderm. In addition, their distribution in the polyp body wall differs from that in sea pansies in that it is patchy without striking changes in cell density. This may reflect profound differences in the patterning of the cell populations and in cell type expressing this receptor between octocorallians and hexacorallians. It is difficult to classify the type of cells expressing the RXR α -like protein in staghorn corals because of the variety of shapes they display and because of the scarcity of literature on scleractinian histology and neuroanatomy. The cell morphology ranges from round/oval cells to elongated cells that display varying degrees of discontinuity in thickness. Their location near the ectoderm-mesoglea interface and the extension of their processes along the plane of that interface suggest that they represent classical cnidarian «ganglion nerve cells» (Saripalli and Westfall 1996).

Their range of morphologies suggest that various differentiation stages of these nerve cells are visualized, from interstitial cells, which are round/ovoid multipotent cells known to be present in the basiectoderm (Bode 1996), to fully differentiated nerve cells. If this interpretation is valid, a role for the expressed RXR α -like receptor in coral nerve cell differentiation needs to be investigated.

In this study the RXR antibody stained both the nucleus and cytoplasm of cells although RXR receptors are nuclear receptors. This may be due to the receptors being in an inactive state. Some steroid receptors are localized in both the nucleus and cytoplasm when unexposed to their ligand, but their distribution shifts to the nucleus upon hormonal exposure (Hager et al. 2000). The mammalian RXR receptor may associate with its heterodimerization partner, the vitamin D receptor (VDR), in the cytoplasm before entering the nucleus, thereby influencing the intracellular distribution of RXR (Prüfer et al. 2000). It thus appears that the intracellular localization of the nuclear receptor depends on several factors, such as its state of activation and its binding or not to a heterodimer. As the sea pansy and coral tissues used in immunohistochemistry were not exposed artificially to retinoic acid or any other hormone, and were anesthetized before fixation, it is not surprising that the staining is not regionally localized inside the cells. But we can't exclude the possibility of a natural exposition of the used specimens to retinoic acid.

Together with the cloning of RXR receptors in a sponge (Wiens et al. 2003) and in a cubozoan jellyfish (Kostrouch et al. 1998), the immunological detection of a RXR-like protein in sea pansies and in staghorn corals suggests that this receptor

type is evolutionary ancient. Our results suggest also that the retinoic acid-like receptor may somehow be involved in ectodermal nerve cell differentiation and patterning. It will be necessary to clone and express the putative RXR receptor of these two anthozoans in order to gain insights into their evolution and function.

References

- Bode HR (1992) Continuous conversion of neuron phenotype in hydra. *Trends Genetics* 8: 279-284.
- Bode HR (1996) The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J Cell Sci* 109: 1155 – 1164.
- Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10: 940-54.
- Conlon RA (1995) Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends Genet* 11: 314-319.
- Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB (1998) Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem* 70: 1366-1375.
- Eberhardt DM, Will WA, Godkin JD (1999) Retinol administration to hyperovulated ewes improves *in vitro* embryonic viability. *Bio Reprod* 60: 1483-1487.
- Fautin DG, Mariscal RN (1991) Microscopic Anatomy of Invertebrates: Vol. 2 Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora, eds. Harrison FW, Westfall JA Wiley-Liss, New York.
- Freebern WJ, Osman A, Niles EG, Christen L, LoVerde PT (1999) Identification of cDNA codinf for Retinoid X Receptor homologue from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 274: 4577-4585.
- Grasso LC, Hayward DC, Trueman JWH, Hardie KM, Janssens PA, Ball EE (2001) The evolution of nuclear receptors: evidence from the coral *Acropora*. *Mol Phylog Evol* 21: 93-102.
- Hager GL, Lim CS, Elbi C, T. Baumann CT (2000) Trafficking of nuclear receptors in living cells. *J Ster Biochem Mol Biol* 74: 249-254.
- Hall BL, Thummel CS (1998) The RXR homolog Ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Development* 125: 4709-4717.
- Haskell GT, LaMantia AS (2005) Retinoic acid signaling identifies a distinct precursor population in the developing and adult forebrain. *J Neurosci* 25: 7636-7647.

- Imiecke G, Borojevic R, Custodio M, Müller WEG (1996) Retinoic acid acts as morphogen in freshwater sponges. *Inv Reprod Dev* 26: 89-98.
- Kostrouch Z, Kostrouchova M, Love W, Jannini E, Piatigorsky J, Rall JE (1998) Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13442-13447.
- Krezel W, Kastner P, Chambon P (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89: 1291-1300.
- Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D (1992) Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J* 11: 1003-1013.
- Liao YP, Ho SH, Liou JC (2004) Non-genomic regulation of transmitter release by retinoic acid at developing motoneurons in *Xenopus* cell culture. *J Cell Sci* 117: 2917-2924.
- Lyke EB (1965) The histology of the sea pansies *Renilla reniformis* (Pallas) and *Renilla koellikeri* Pfeffer a note on the fine structure of the latter species. Ph.D thesis, University of Wisconsin.
- Mc Caffery P, Dräger UC (1994) Hot spots of retinoic acid synthesis in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7194-7197.
- Misner DL, Jacobs S, Shimizu Y, Urquiza AM, Solomin L, Perlmann T, De Luca LM, Stevens CF, Evans RM (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11714-11719.
- Müller WA (1984) Retinoids and pattern formation in a hydroid. *J Embryol Exp Morph* 81:253-271.
- Niederreither K, Subbarayan V, Dollé P, Chambon P (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation. *Nat Genet* 21: 444-448.
- Pernet V, Anctil M (2002) Annual variations and sex-related differences of estradiol-17 β levels in the anthozoan *Renilla koellikeri*. *Gen Comp Endocr* 129: 63-68.
- Prüfer K, Racz A, Lin GC, Barsony J (2000) Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors. *J Biol Chem* 275: 41114-41123.

- Saripalli LD, Westfall JA (1996) Classification of nerve cells of the sea anemone *Calliactis parasitica*. Biol Bull 190: 11-124.
- Schubert M, Holland ND, Escriva H, Holland LZ, Laudet V (2004) Retinoic acid influences anteroposterior positioning of epidermal sensory neurons and their gene expression in a developing chordate (amphioxus). Proc Natl Acad Sci USA 101: 10320-10325.
- Shea C, Hough D, Xiao J, Tzertzinis G, Maina CV (2004). An rxr/usp homolog from the parasitic nematode, *Dirofilaria immitis*. Gene 324: 171-182.
- Sutherland JD, Kozlova T, Tzertzinis G, Kafatos F (1995) *Drosophila* hormone receptor 38 : A second partner for *Drosophila* USP suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type. PNAS 92: 7966-7970.
- Tarrant AM, Atkinson S, Atkinson MJ (1999) Estrone and estradiol-17 β concentration in tissue of the scleractinian coral, *Montipora verrucosa*. Comp Biochem Physiol A 122: 85-92.
- Tarrant AM, Atkinson MJ, Atkinson S (2004) Effects of steroidal estrogens on coral growth and reproduction. Mar Ecol Progr Ser 269: 121-129.
- Umbriaco D, Anctil M, Descarries L (1990) Serotonin-immunoreactive neurons in the cnidarian *Renilla koellikeri*. J Comp Neurol. 291: 167-178.
- Wang SF, Miura K, Miksicek RJ, Segraves WA, Raikhel AS (1998) DNA binding and transactivation characteristics of the mosquito ecdysone receptor-ultraspiracle complex. J Biol Chem 273: 27531-27540.
- Wiens M, Batel R, Korzhev M, Müller WEG (2003) Retinoid X receptor and retinoic acid response in the marine sponge *Suberites domuncula*. J Exp Biol 206: 3261-3271.
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. Nature 366: 476-479.

Legends to figures

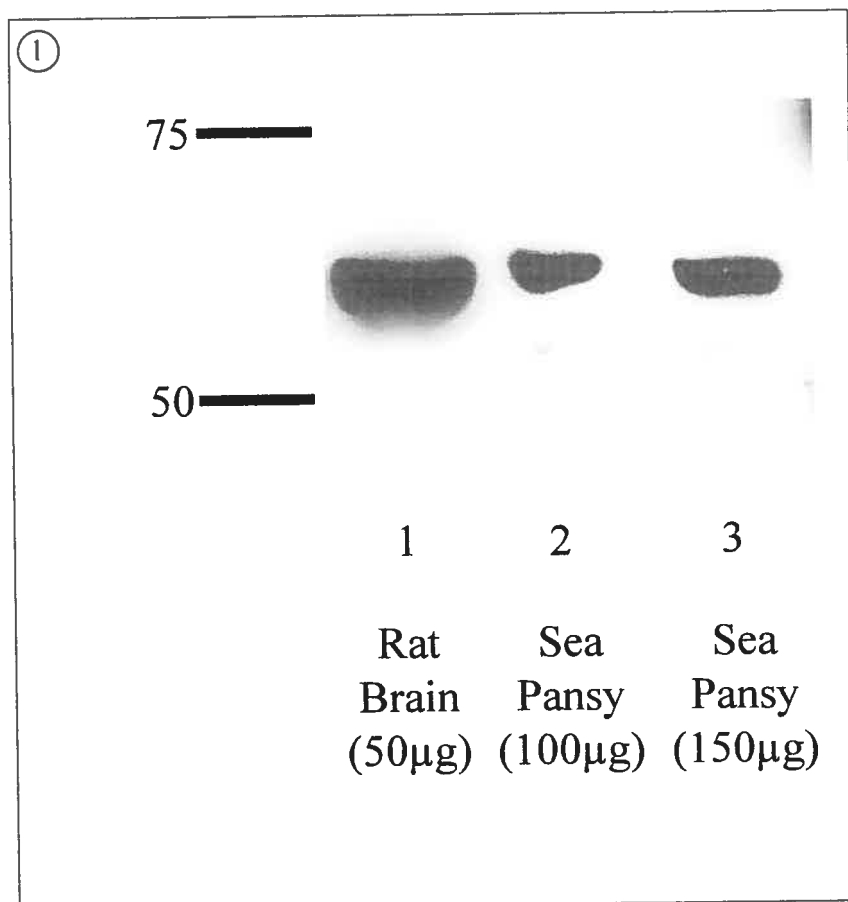
Fig. 1. Immunoblots of RXR α -like immunoreactivity from extracts of rat brain (lane 1, 50 μ g) and of sea pansy (lane 2, 100 μ g; lane 3, 150 μ g).

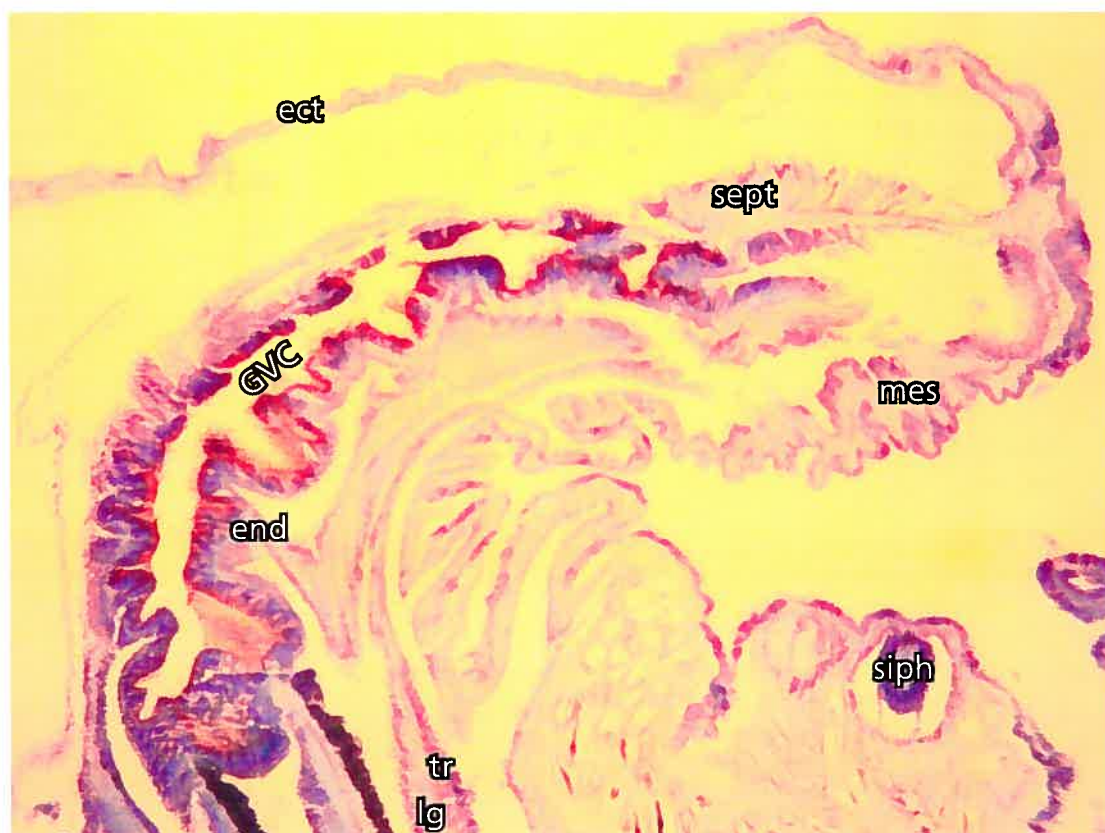
Fig. 2. Histological organisation of the sea pansy. Ectoderm (ect), endoderm (end), mésoglée (mes), gastrovascular cavity (GVC), septum (siphonozoid), retractor longitudinal muscle (lg), transverse radial muscle (tr).

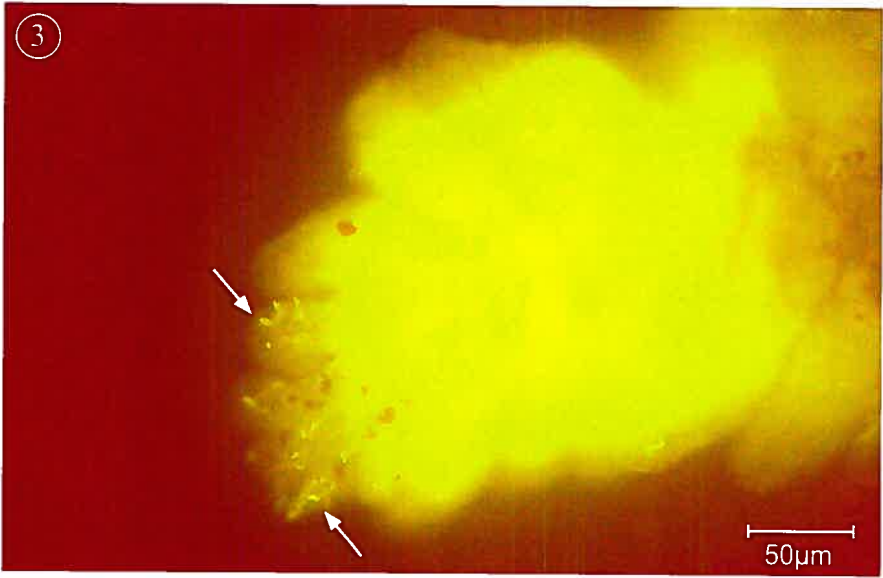
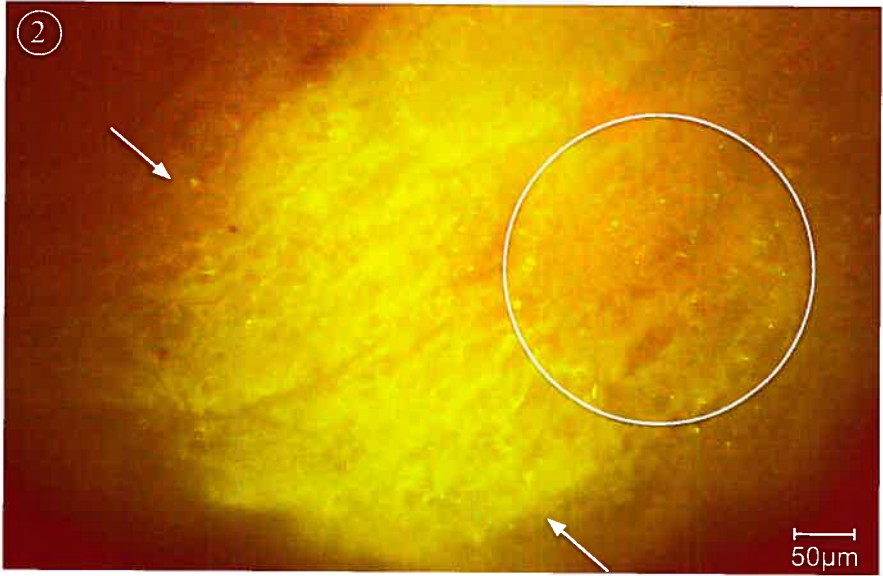
Figs. 3-4. Whole-mounts of RXR α -like immunohistochemical reactions in sea pansies. Fig. 3 shows individual cells in one area of the polyp body wall (circled) and densely packed cells in an adjacent area (between arrows). Fig. 4 shows the intense fluorescence of a tentacle masking the individual immunoreactive cells which are visible in the thinner pinnules at the tip of the tentacle (arrows).

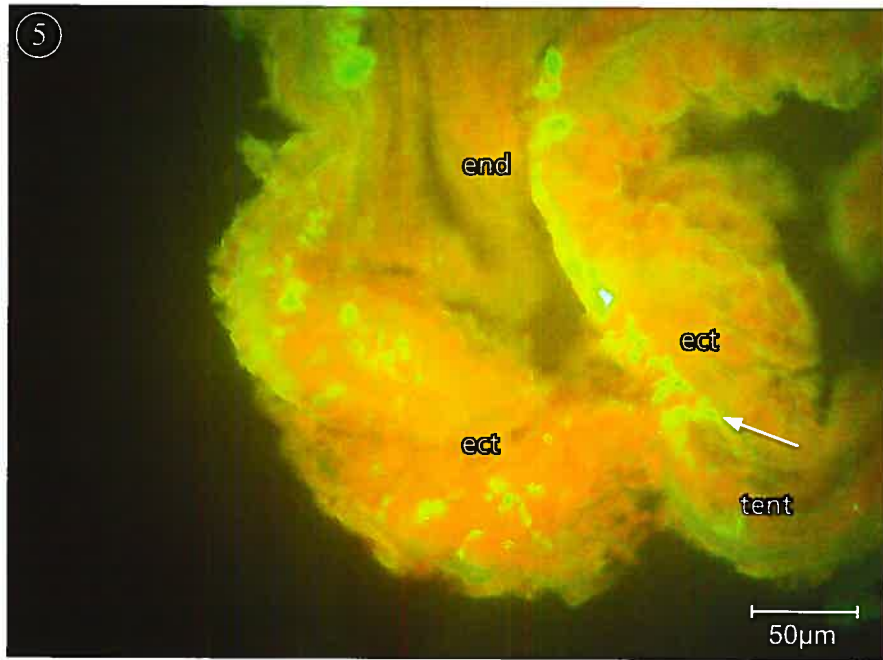
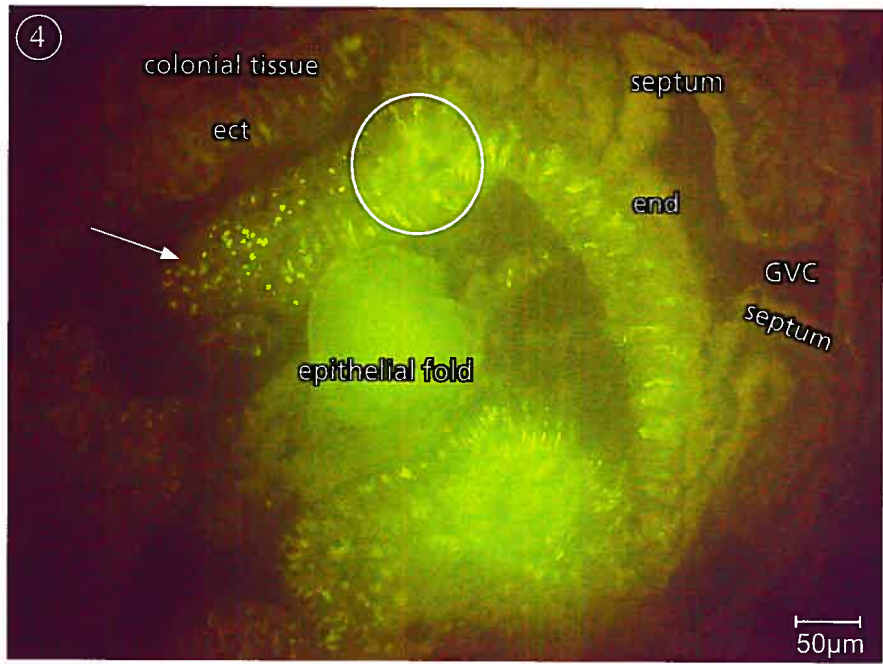
Figs. 5-6. RXR α -like immunoreactivity shown in sections of sea pansies. Fig. 5 shows a polyp that is retracted by inversion within its receptacle inside the colonial mass. The stained ectodermal epithelium of the polyp (green) shows immunoreactive cells across its thickness (circle). Due to regional twistings of the body wall some stained cells are seen transversally (arrow). Note the ectoderm (ect) of the colonial mass and the polyp endoderm (circular muscle, end) which along with the septa enclose the gastrovascular cavity (GVC). Fig. 6 shows immunoreactive cells in the thickened ectoderm (ect) of the oral disk region. Note the base of a tentacle (tent).

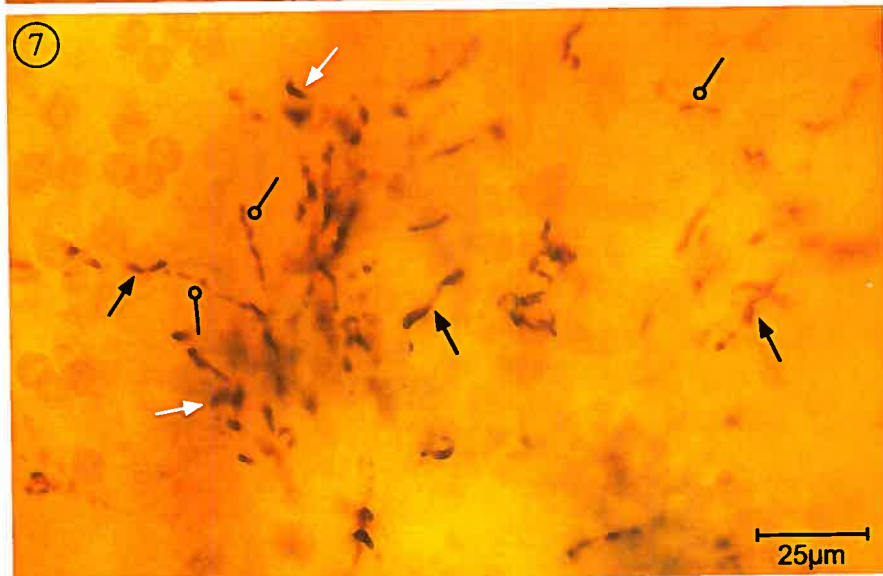
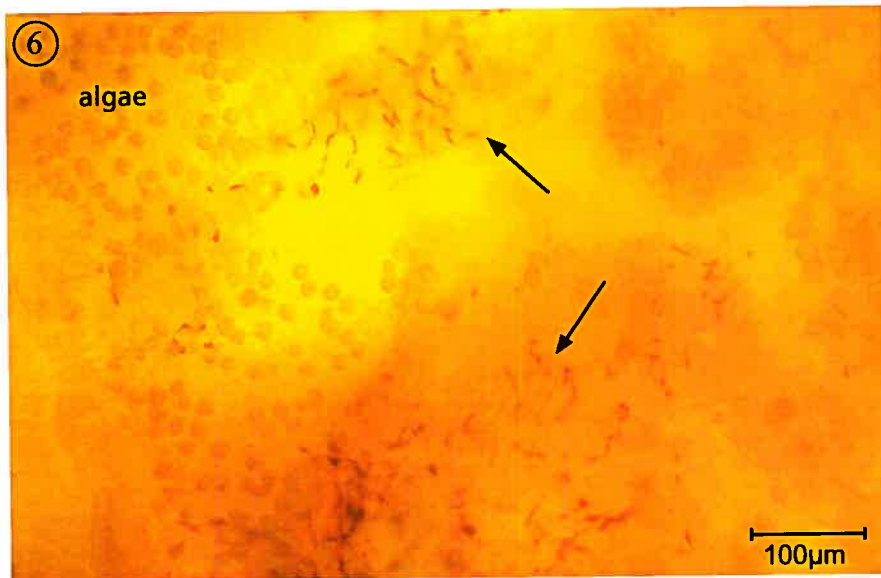
Figs. 7-9. Whole-mounts of RXR α -like immunohistochemical reactions in staghorn corals. Fig. 7 shows a low-power view of a polyp body wall where immunoreactive clusters of stained cells with short processes are seen. Note unstained symbiotic algal cells. Fig. 8 is an enlarged view of stained cells in the body wall with different shapes: varicose (black circle arrows), variable swellings (black triangle arrows) and round/oval (white triangle arrows). Fig. 9 shows that immunoreactive cells are at the base of the ectoderm. Note the concentration of symbiotic algal cells in the endoderm.











Chapitre III

II. Discussion générale et conclusion

L'anticorps primaire utilisé pour ce projet est spécifique pour la séquence (256-268) du récepteur de l'acide rétinoïque RXR α humain. Afin de démontrer que cet anticorps reconnaît une protéine susceptible de correspondre à un récepteur de l'acide rétinoïque chez la pensée de mer, nous avons effectué un immunobuvardage. Au moyen de cette expérience, nous avons pu visualiser des bandes qui migrent au poids moléculaire prévu de la protéine ciblée (64 Kd). Avec les deux extraits de la pensée de mer, nous avons obtenu une bande dans chaque puits au même niveau. Ces bandes diffèrent en intensité proportionnellement à la concentration des extraits. Cette technique nous permet de suggérer que le marquage observé en immunohistochimie correspond à un récepteur de type RXR.

Afin de valider davantage ces résultats, nous avons pensé à faire co-migrer les extraits de pensée de mer avec un extrait où l'on sait pertinemment que la protéine recherchée est présente. Le récepteur rétinoïque RXR α est connu chez le rat (Cullingford et al, 1998) et plusieurs études ont tenté de déterminer l'effet de l'acide rétinoïque sur les différentes structures du système nerveux des vertébrés (Maden et Holeder 1992; Ruberte et al, 1993; Simeone et al. 1995; Appel et Eisen

2003). En faisant migrer un extrait de cerveau de rat avec les deux extraits de pensée de mer (à deux concentrations différentes), nous nous attendons à obtenir une bande au poids moléculaire connu du récepteur rétinoïque (64Kd), et tel que prévu, la bande obtenue avec l'extrait de cerveau de rat correspondait au poids moléculaire connu du récepteur rétinoïque qui a co-migré avec les bandes correspondant aux extraits de la pensée de mer. Ceci est une preuve de plus que la bande obtenue avec la pensée de mer est spécifique et concerne la protéine recherchée. Des contrôles négatifs ont été également faits en faisant migrer toutes les protéines de la même façon mais en omettant l'anticorps primaire. Cette expérience n'a révélé aucune bande et nous a donc permis de vérifier que l'anticorps secondaire se lie seulement à l'anticorps primaire.

La technique d'immunohistochimie a révélé que les cibles marquées de l'anticorps anti RXR chez la pensée de mer sont des cellules allongées qui semblent être interconnectées. Cette observation suggère que les structures marquées sont essentiellement des structures nerveuses. Ces cellules se retrouvent au niveau de l'ectoderme, sur toute son épaisseur. Ce sont des cellules mono ou bipolaires interconnectées qui forment un réseau dense ou lâche selon les endroits. Les cellules nerveuses marquées possèdent un corps cellulaire allongé et sont pourvues de courts et fins prolongements qui s'enfoncent dans l'ectoderme. La description de ce type de cellules nerveuses qui constituent un plexus nerveux a déjà été rapportée chez la pensée de mer (Lyke, 1965). Les neurones marqués observés nous rappellent les neurones à antho-RFamide observés chez la pensée de mer qui sont dispersés, avec de courts prolongements mono- ou bipolaires (Pernet et al, 2004).

Par contre, ces neurones diffèrent des neurones à sérotonine qui sont pourvus de corps cellulaires arrondis ou ovoïdes et qui possèdent de longs prolongements à bifurcations (Umbriaco et al, 1990).

Chez *Acropora*, les cellules ciblées par cet anticorps se retrouvent au niveau de la colonne du polype. Elles sont localisées exclusivement à la base de l'ectoderme. Ce sont des cellules nerveuses avec des corps cellulaires plus volumineux que ceux qui sont observés chez la pensée de mer. Ces corps cellulaires ont différentes formes: ronds, ovoïdes ou allongés. Certaines de ces cellules apparaissent moins différenciées que d'autres. Les structures nerveuses marquées ne sont pas distribuées de façon homogène dans la colonne du polype. En effet, ces cellules sont localisées par groupes de petites cellules nerveuses qui semblent interconnectées, ces cellules sont pourvues de courts et fins prolongements qui s'enfoncent dans l'ectoderme. La principale différence observée entre ces deux espèces de cnidaires réside au niveau de la distribution des cellules immunoréactives. En effet, chez *Acropora*, elles sont situées uniquement à la base de l'ectoderme, tandis que chez la pensée de mer, elles sont retrouvées sur toute l'épaisseur de l'ectoderme.

Tel que mentionné précédemment, l'acide rétinoïque est connu pour être impliqué dans le développement du système nerveux des vertébrés et pour avoir un effet sur la différenciation des neurones en sous-types spécialisés au niveau de l'ectoderme chez les Chordés (Schubert et al, 2004). Une étude faite chez le poussin a montré que l'application d'acide rétinoïque intervient dans la différenciation des neurones somatiques (Guidato et al., 2003). La spécification de

l'identité des neurones de la colonne motrice latérale CML au niveau brachial de la moelle épinière dépend de l'activation du récepteur rétinoïque dans les neurones post-mitotiques (Sockanathan et al., 2003). Il a été démontré que l'expression de RALDH2 et la synthèse de rétinoïdes par les neurones de la CML a pour conséquence la génération de neurones moteurs additionnels. L'activité des rétinoïdes dans les motoneurones engendre un signal qui contrôle la prolifération des cellules (Sockanathan et Jessell, 1998).

Les cellules marquées retrouvées chez ces deux espèces de cnidaires anthozoaires sont colorées au niveau de toute la cellule nerveuse. On devrait s'attendre à ce que la coloration du noyau soit plus visible étant donné que le récepteur rétinoïque est connu pour être un récepteur nucléaire. L'étude de la distribution cellulaire des récepteurs stéroïdes qui sont des récepteurs nucléaires révèle que la localisation de tous ces récepteurs, sauf le cas des récepteurs à œstrogène, diffère selon la présence ou l'absence d'hormone (Hager et al., 2000). En effet, dans les cellules stimulées par des hormones, les récepteurs sont localisés presque totalement au niveau du noyau. Quand les cellules cibles ne sont pas exposées à l'hormone, ces récepteurs se retrouvent aussi en grand nombre au niveau du cytoplasme. On a démontré que cette localisation dépendait non seulement de la localisation nucléaire du signal NLS mais elle subit également des contraintes imposées par plusieurs partenaires appartenant au complexe macromoléculaire associé au récepteur (Hager et al., 2000). D'autre part, la localisation du RXR avec son partenaire d'hétérodimérisation, le récepteur de la vitamine D (VDR), a été étudiée. Il a été démontré que le RXR promouvoit l'accumulation du VDR au

niveau du noyau et contribue ainsi à la régulation de l'activité de VDR. L'hétérodimère RXR/VDR peut se former dans le cytoplasme. L'hétérodimérisation de RXR et VDR peut influencer leur distribution (Prüfer et al., 2000). Toutes ces données indiquent que la localisation intracellulaire du récepteur nucléaire dépend de plusieurs facteurs, tel que son état d'activation et sa liaison ou non à son hétérodimère. C'est ce qui pourrait expliquer le fait que la coloration se retrouve dans toute la cellule nerveuse et qu'elle n'est pas plus intense au niveau du noyau, d'autant plus que les tissus utilisés pour faire l'immunohistochimie n'ont pas été exposés à l'acide rétinoïque ou autre hormone avant leur fixation.

Chez la pensée de mer et chez *Acropora*, la présence du marquage exclusivement au niveau de l'ectoderme du polype nous renseigne que ce récepteur est exprimé à un stade de différenciation bien précis du développement puisque, dans une autre classe de Cnidaires, l'hydre, on a rapporté que le stade de différenciation de la cellule dépendait de sa position dans le tissu (Bode, 1996). En effet, la cellule est plus au moins différenciée selon sa position le long du polype et sa différenciation est tributaire de toutes les conditions environnantes. La présence du récepteur rétinoïque au niveau de l'ectoderme indiquerait que la cellule est dans un stade de différenciation bien précis.

Les cellules marquées sont observées dans les coupes faites sur des colonies prélevées pendant la période de ponte. L'expression du récepteur chez ces deux cnidaires anthozoaires a été observée pendant la période de ponte et de reproduction qui se produisent pendant une bonne partie de la période Mai-Juin pour la pensée de mer.

Ceci suggère le rôle du récepteur rétinoïque dans le maintien de l'état différencié. Ceci nous fait penser au rôle du récepteur rétinoïque chez les vertébrés qui semble être impliqué dans la spécification de l'identité des motoneurones (Sockanathan et Jessell, 1998). Sa présence au niveau de l'ectoderme de la pensée de mer concorde avec la littérature. Le récepteur rétinoïque interviendrait dans le maintien du signal de la différenciation des cellules neuronales. Il est donc impliqué dans la voie de différenciation des neurones. À un stade précis du développement, les neurones (marqués) deviennent ciblés par l'acide rétinoïque, ceux-ci expriment le récepteur rétinoïque. L'acide rétinoïque aurait donc un rôle morphogénétique qui entraînerait une régulation positive des gènes comme dans le cas de *S. domuncula* (Wiens et al., 2003).

Plusieurs récepteurs nucléaires ont été étudiés chez les invertébrés afin de les comparer avec ceux des vertébrés sur les deux plans : génétique et fonctionnel. Chez les nématodes, il a été montré que DAF-12, qui est un récepteur nucléaire orphelin chez *C. Elegans*, intervient dans la reproduction, le développement et le métabolisme des lipides. Ce premier récepteur stéroïde découvert chez les nématodes est un récepteur nucléaire orphelin d'invertébrés. Il intervient dans la régulation de la reproduction par les stéroïdes du point de vue biologique et moléculaire. Ce rôle aurait été conservé depuis les vers jusqu'aux humains (Motola et al., 2006). La séquence d'acides aminés du gène RXR des acariens chez *Amblyomma americanum* a été clonée et étudiée. La comparaison de la séquence de USP avec le gène RXR des vertébrés révèle étrangement que la séquence du DLL de celui-ci présente plus de similarité dans la séquence d'acides aminés avec le

RXR de vertébrés (71%) qu'avec celui de la protéine ultraspiracle USP qui est l'orthologue du récepteur rétinoïque (52%) (Guo et al., 1998).

Une étude portant sur l'origine des récepteurs stéroïdes et rapportant l'isolement d'un orthologue du récepteur à œstrogène du mollusque *Aplysia californica* a permis la caractérisation expérimentale des domaines fonctionnels de cette protéine ancestrale de laquelle tous les récepteurs stéroïdes SR existants ont évolué. Les résultats indiquent que les SR sont extrêmement anciens et répandus, ils se sont diversifiés à partir d'un seul récepteur apparu avant l'apparition de la symétrie bilatérale. Ce récepteur a eu une fonction analogue au récepteur à œstrogène. Ce gène ne se retrouve pas dans la lignée des arthropodes et des nématodes et il est devenu indépendant du règlement d'hormone dans la lignée d'*Aplysia* (Thornton et al., 2003). Toutes ces données nous renseignent sur l'importance de l'étude des récepteurs nucléaires chez les invertébrés, puisque cette étude nous donne une idée sur leur origine non seulement du point de vue génétique mais aussi fonctionnel.

La mise en évidence de l'existence d'un récepteur de type rétinoïque chez la pensée de mer et chez *Acropora* suggère que ce récepteur est ancien du point de vue évolutif. En effet, le clonage de ce récepteur chez les spongiaires confirme que ce récepteur a une origine très ancienne (Wiens et al., 2003). Chez un autre cnidaire, *T. cystophora*, un récepteur RXR a été également cloné (Kostrouch et al., 1998). Ce récepteur serait assez conservé du point de vue génétique. Nos résultats suggèrent qu'il aurait aussi conservé son rôle, même si ce rôle a évolué et que le récepteur rétinoïque se retrouve impliqué dans plusieurs processus biologiques chez les vertébrés. Nous émettons l'hypothèse, d'après nos résultats, que le rôle du récepteur

RXR chez ces deux espèces de cnidaires en serait un dans le maintien de l'état différencié des cellules nerveuses.

Les résultats trouvés et analysés lors de ce projet de recherche suggèreraient la présence d'un récepteur de type RXR chez la pensée de mer et chez *Acropora*. Celui-ci pourrait être impliqué essentiellement dans le maintien de l'état différencié des cellules nerveuses du plexus nerveux de la pensée de mer et d'*Acropora*. L'étude des récepteurs nucléaires chez les invertébrés a révélé que l'apparition de certains de ces récepteurs au cours de l'évolution ne s'est pas faite d'une manière linéaire. En effet, le séquençage de ces récepteurs a révélé que du point de vue moléculaire, certains présentent plus de similitudes avec le récepteur humain qu'avec le récepteur d'invertébrés phylogénétiquement proches. La suite de ce projet serait d'approfondir les investigations dans cette direction en abordant ce même projet d'une manière plus directe. Des récepteurs de type RXR ont déjà été caractérisés et clonés chez plusieurs invertébrés comme l'acarien *Amblyomma americanum* et la méduse *Tripedalia cystophora*. Ces travaux fournissent des séquences connues et conservées des récepteurs de types RXR qui pourront être utilisées afin d'isoler des membres de la même famille chez la pensée de mer. Ceci permettra la réalisation de l'expression fonctionnelle de ces récepteurs afin de déterminer leurs propriétés moléculaires et d'en faire l'étude comparative. Suite à ces travaux une analyse phylogénétique pourrait être réalisée. Ultimement, un parallèle pourrait être établi entre l'apparition de ces facteurs de transcription importants dans le développement et l'apparition de caractères morphologiques, particulièrement au niveau de l'organisation des systèmes nerveux primitifs.

Références

- Ahn M.J., Langenfeld J., Moasser M.M., Rusch V., Dmitrovsky E. (1995) Growth suppression of transformed human bronchial epithelial cells by all-trans-retinoic acid occurs through specific retinoid receptors. *Oncogene* **11**: 2357-64.
- Allegretto E.A., McClug M.R., Lazarchik S.B., Clemn D.L., Kerner S.A., Elgort M.G., Boehem M.F., White S.K., Pike J.W., Hyeman R.A. (1993) Transactivation properties of retinoic and retinoid X receptors in mammalian cells in yeast. *J Biol Chem* **268**: 26625-33.
- Anctil M., Hurtubise P, Gillis M.A. (2002) Tyrosine hydroxylase and dopamine- β hydroxylase immunoreactivities in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *Cell Tissue Res* **310**: 109-17
- Appel B., Eisen J.S. (2003) Retinoids run rampant: multiple roles during spinal cord and motor neuron development. *Neuron* **40**:461-4.
- Batham E.J (1965) The neural architecture of the sea anemone *Mimetricidium cryptum*. *Amer Zool* **5**:395-402.
- Batham E.J., Robson E.A. (1960) The nerve net of the sea anemone *Metridium senile*: The mesenteries and the column. *Quart J micr Sci* **101**: 487-510.
- Bode H.R. (1996) The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J Cell Sci* **109**: 1155 – 64.
- Bollag W. (1996) The retinoid revolution. Overview *FASEB J* **10**: 938-9.
- Brown D., Kogan S., Lagasse E., Weissman I., Alcalay M., Pelicci P.G., Atwater S., Bishop J.M. (1997) A PML-RAR α transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2551-6.
- Buisson B., Franc S. (1969) La structure et l'ultrastructure des cellules mesenchymateuses et nerveuses intramesogléennes de Veretillum cynomorium Pall. (Cnidaire, Pennatulidae). *Vie et Milieu* **20** (2-A):279-291.
- Carpenter E.M. (2002) Hox genes and spinal cord development. *Dev Neurosci* **24**: 24-34.
- Case J.F. (1979) Biology 2nd eds. Macmillan, New York.

- Chakravarti D., Lamorte V.J., Nelson M.C., Nakajima T., Schulman I.G., Juguilon H., Montminy M., Evans R.M. (1996) Role of the CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**: 99-103.
- Chambon P. (1994) The retinoid signalling pathway: molecular and genetic analyses. *Semin Cell Biol* **5**: 115-25.
- Chambon P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* **10**: 940-54.
- Chen J.D., Evans R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**: 454-7.
- Chevalier J., Doumenc C., Herberts C., Lafuste L., Senenoff-Tiam-Chansky P., Tiffon Y., Tixier-Durivault A., Van Praet M. (1987) Cnidaires anthozoaires. In *traités de zoologie*. Masson Paris vol **3**: 859.
- Ciana P., Braliou G.G., Demay F.G., Von Lindern M., Barettino D., Beug H., Stunnenberg H.G. (1998) Leukemic transformation by the v-ErbA oncoprotein entails constitutive binding to and repression of an erythroid enhancer *in vivo*. *EMO J* **17**: 7382-9.
- Clagett-Dame M., Plum L.A. (1997) Retnoid-regulated gene expression in neural development. *Crit Rev Euk Gen Expr* **7**: 299-342.
- Collins M.D., Mao G.E. (1999) Teratology of retinoids. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 399-430.
- Conlon R.A. (1995) Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends Genet* **11**: 314-9.
- Cullingford T.E., Bhakoo K., Peuchen S., Dolphin C.T, Patel R., Clark J.B. (1998) Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem* **70**: 1366-75.
- Dong D., Noy N. (1998) Heterodimer formation by retinoid X receptor: regulation by ligands and by the receptor's self-association properties. *Biochemistry* **37**: 10691-700.
- Eberhardt D.M., Will W.A., Godkin J.D. (1999) Retinol administration to superovulated ewes improves *in vitro* embryonic viability. *Bio Reprod* **60**: 1483-7

- Fujiwara S., Kawamura K. (2003) Acquisition of retinoic acid signaling pathway and innovation of the chordate body plan. *Zoo Sci* **20**:809-18.
- Grasso L.C., Hayward D.C., Trueman J.W.H., Hardie K.M., Janssens P.A., Ball E.E. (2001) The evolution of nuclear receptors: evidence from the coral *Acropora*. *Mol Phylog Evol* **21**: 93-102.
- Gudas L. J. (1994) Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* **269**: 15399-402.
- Guidato S., Barrett C., Guthrie S. (2003) Patterning of motor neurons by retinoic acid in the chick embryo hindbrain in vitro. *Mol Cell Neurosci* **23**:81-95.
- Guo X. , Xu Q. , Harmon M. A., Jin X. , Laudet V. , Mangelsdorf D. J. Palmer M. J. (1998) Isolation of two functional retinoid X receptor subtypes from the Ixodid tick, *Amblyomma americanum* (L.). *Mol Cel Endocrin1* **39**: 45-60.
- Hager G.L., Lim C.S., Elbi C., T. Baumann C.T. (2000) Trafficking of nuclear cells. *J Ster Biochem Mol Bio* **74**: 249-254. receptors in living
- Horlein A.J., Naar A.M., Heinzel T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstrom M., Glass C.K. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**: 397-404.
- Imiecke G., Borojevic R., Custodio M., Müller W.E.G. (1996) Retinoic acid acts as morphogen in freshwater sponges. *Inv Reprod Dev* **26**: 89-98.
- Kadosh D., Struhl K. (1998) Targeted recruitment of the Sin-Rpd3 Histone deactalase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol Cell Biol* **18**: 5121-27.
- Kastendiek J.E. (1975) The role of behaviour and interspecific interactions in determining the distriution and abundance of *Renilla koellikeri* pfeffer. Ph.D thesis. University of California.
- Kitabayashi I., Chiu R., Umesono K., Evans R.M., Gachelin G., Yokoyama K. (1994) A novel pathway for retinoic acid-induced differenciation of F9 cells that is distinct from receptor-mediated trans-activation. *In Vitro Cel Dev Bio An* **30A**: 761-8.
- Kostrouch Z., Kostrouchova M., Love W., Jannini E., Piatigorsky J., Rall J.E. (1998) Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13442-47.

- Kurokawa R., Soderstrom M., Horlein A. , Halachmi S., Brown M., Rosenfeld M.G., Glass C.K. (1995) Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* **377**: 451-4.
- Leber B.F., Denburg J.A. (1997) Retinoic acid modulation of induced basophile differentiation. *Allergy* **52**: 1201-6.
- Lee S.K., Na S.Y., Kim H.J., Soh J., Choi H.S., Lee J.W. (1998) Identification of Critical Residues for Heterodimerization within the Ligand-Binding Domain of Retinoid X Receptor. *Mol Endocrino* **12**: 325-32.
- Lefebvre B., Brand C., Lefebvre P., Ozato K. (2002) Chromosomal integration of retinoic acid response elements prevents cooperative transcriptional activation by retinoic acid receptor and retinoid X receptor. *Mol Cell Biol* **5**: 1446-59
- Leid M., Kastner P., Lyons R., Nakshatri H., Saunders M., Zacharewski T., Chen J.Y., Staub A., Garnier J.M., Mader S. (1992) Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* **68**: 377-95.
- Lequeu B. (1990) Vitamine A: acquisitions récentes. Cachan eds. Editions médicales internationales. France.
- Lyke E.B. (1965) The histology of the sea pansies *Renilla reniformis* (Pallas) and *Renilla Koellikeri* Pfeffer a note on the fine structure of the latter species. Ph.D thesis. University of Wisconsin.
- Maden M., Hoder N. (1992) Retinoic acid and development of the central nervous system. *Bioessays* **14**: 431-38.
- Marshall H., Morisson A., Studer M., Pöpperl H., Krumlu R. (1996) Retinoids and Hox genes. *FASEB J* **10**: 969-78.
- Mc Caffery P., Dräger U.C. (1994) Hot spots of retinoic acid synthesis in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 7194-97.
- Means A.L., Gudas L.J. (1995) The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu Rev Biochem* **64**: 210-33.
- Meyer M.E., Gronemeyer H., Turcotte B., Bocquel M.T., Tasset D., Chambon P. (1989) Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* **57**: 433-42.

- Mic F.A., Sirbu I.O., Duester G. (2004) Retinoic Acid Synthesis Controlled by *Raldh2* is required early for limb bud initiation and then later as a proximodistal signal during apical ectodermal ridge formation. *Biol Chem* **279**: 26698-706.
- Motola D. L., Cummins C. L., Rottiers V., Sharma K.K., Li T., Li Y., Suino-Powell K., Xu H. E., Auchus R. J., Antebi A., Mangelsdorf D.J (2006) Identification of Ligands for DAF-12 that Govern Dauer Formation and Reproduction in *C. elegans*. *Cell* **124** : 1209-23.
- Napoli J. L. (1996) Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* **80**: 52-62.
- Niederreither K., Subbarayan V., Dollé P., Chambon P. (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation. *Nat Genet* **21**: 444-8.
- Novitch B.G., Wichterle H., Jessel T.M., Sockanathan S. (2003) A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron* **40**: 81-95.
- Pani A.K., Anctil M., Umbriaco D. (1995) Neural localization and evoked release of norepinephrine in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J Exp Zoo* **272**: 1-12.
- Pernet V., Anctil M., Grimmelikhuijzen C.J.P (2004) Antho-RFamide-Containing Neurons in the primitive nervous system of the anthozoan *Renilla koellikeri*. *JComp Neur* **472**:208-20.
- Prüfer K., Racz A., Lin G. C., Barsony J. (2000) Dimerization with Retinoid X Receptors Promotes Nuclear Localization and Subnuclear Targeting of Vitamin D Receptors. *J Bio Chem* **52**: 41114-23.
- Roberts A.B., Sporn M.B. (1984) Cellular Biology and Biochemistry of the retinoids. The rétinoids, Sporn M B, Roberts A B and Goodman D S, eds. Academic Press, Orlando.
- Ruberte E., Friederich V., Chambon P. and Morriss-Kay G. (1993) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system. *Development* **118**: 267-82.
- Sandelin A., Wasserman W.W. (2004) Prediction of Nuclear Hormone Receptor Response Elements. *Mol Endocr* **19**: 595-606.
- Schubert M., Holland N.D., Escriva h., Holland L.Z. Laudet V. (2004) Retinoic acid influences anteroposterior positioning of epidermal sensory neurons and their gene expression in a developing chordate (amphioxus). *PNAS* **101**: 10320-5.

- Shenefelt R.E. (1972) Morphogenesis of malformation in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology* **5**: 103-18.
- Simeone A., Avantaggiato V., Moroni M.C., Mavilio F., Arra C., Cotelli F., Nigro V., Acampora D. (1995) Retinoic acid induces stage-specific antero-posterior transformation of rostral central nervous system. *Mech Dev* **51**: 83-98.
- Smarda J., Sugarmam J., Glass C., Lipstick J. (1995) Retinoic acid receptor α supresses transformation by v-myb. *Mol Cell Biol* **15**: 2474-81.
- Sockanathan S., and Jessell T.M. (1998) Motor Neuron-Derived Retinoid Signaling Specifies the Subtype Identity of Spinal Motor Neurons. *Cell* **94**: 503-514.
- Sockanathan S., Perlmann T., Jessell T. M. (2003) Retinoid Receptor Signaling in Postmitotic Motor Neurons Regulates Rostrocaudal Positional Identity and Axonal Projection Pattern. *Neuron* **40**: 97-111.
- Squire L.R., Bloom F. E., McConnel K., Roberts J. L., Spitzer N. C., Zigmond M. J. (1998) Fundamental neuroscience. Second edition. Academic Press.
- Takada T., Kinkori T., Muramatsu H., Hayakawa A., Torii S., Muramatsu T. (1997) Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine, is a novel regulator of intracellular calcium in human neutrophils. *Biochem Bioph Res Co* **241**: 756-61.
- Talmage D.A., Lackey R.S. (1992) Retinoic acid receptor α supresses polynavirus transformation and c-fos expression in rat fibroblasts. *Oncogene* **7**: 1837-45.
- Thornton J. W., Need E., Crews D. (2003) Resurrecting the Ancestral Steroid Receptor: Ancient Origin of Estrogen Signaling. *Science* **301**: 1714 -7.
- Umbriaco, D., Anctil, M., Descarries, L. (1990) Serotonin-immunoreactive neurons in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J Comp Neurol*. **291**: 167-78.
- Underwood B. A., Arthur P. (1996) The contribution of vitamin A to public health. *FASEB J*. 1040-8.
- Wei L. (2003) Retinoid receptors and their coregulators. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. **43**: 47-72.
- Wiens M., Batel R., Korzhev M., Müller W.E.G. (2003) Retinoid X receptor and retinoic acid response in the marine sponge *Suberites domuncula*. *J Exper Bio* **206**: 3261-3271.

- Wilson E. B.(1882) The development of renilla. Phil Trans R Soc Lond B **174**: 723-815.
- Wilson J.G., Roth C.B, Warkany J. (1953) An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. Am J Anat **92**: 189-217.
- Xu L., Glass C.K., Rosenfeld M.G. (1999) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. Curr Opin Genet Dev **9**: 140-7.
- Zechel C., Shen X.Q., Chambon P., Gronemeyer H. (1994) Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding on RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. Embo J **13**: 144-24.
- Zhao D., McCaffery P., Ivins K.J., Neve R.L., Hogan P., Chin W.W., Drager U.C. (1996) Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde specific dehydrogenase. Eur J Biochem **240**: 15-22.

